

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI

SİSPLATİN UYGULANAN SIÇANLARIN
TESTİSLERİNDE MEYDANA GELEN
DEĞİŞİKLİKLER VE BU DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE
KURKUMİNİN ETKİSİ

ŞENGÜL ŞENTÜRK
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
VTF-16012 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2020

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Şengül ŞENTÜRK tarafından hazırlanan “Sisplatin Uygulanan Sıçanların Testislerinde Meydana Gelen Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine Kurkuminin Etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/04/2020

| | | |
|------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Üye (T.D.) | : Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi |
| Üye | : Prof. Dr. Şadiye KUM | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi |
| Üye | : Prof. Dr. Hümeysra ÜNSAL | Aydın Adnan Menderes Üniversitesi |
| Üye | : Prof. Dr. Artay YAĞCI | Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi |
| Üye | : Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ | Afyon Kocatepe Üniversitesi |



ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Süleyman AYPAK
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda desteklerini benden esirgemeyen, tezimin her anında bana yardımcı olan değerli danışmanım Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI'ya, birikimlerini güler yüzleriyle paylaşan kürsümüzün öğretim üyeleri değerli hocalarım Prof. Dr. Ülker EREN, Prof. Dr. Şadiye KUM ve Prof. Dr. Levent KARAGENÇ'e, her aradığımda bana yardımcı olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Göksel DOĞAN ve Dr. Seçil ZORLU KOÇ'a ;

Deneysel çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Boğaziçi Üniversitesi Deneysel Hayvan Bakım ve Üretim Birimi (Vivarium) sorumlusu Dr. Arzu TEMİZYÜREK ve birimin değerli personeline,

Elektron mikroskopi çalışmalarımı gerçekleştirmemde bana yol açan İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU, Doç Dr.Tuğba KOTİL ve birimin değerli personelleri Bio. Funda ONAR, Uzm. Bio. Ebru KARABULUT AKYÖN ve Uzm. Bio. Fadime AKTAR'a,

Işık mikroskopik işlemleri gerçekleştirmemde bana destek olan İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı personeli arkadaşım Uzm. Bio. Mehmet Ali DOĞAN'a,

İstatistik çalışmalarımda bana yol gösteren Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL'a,

Tüm bu zorlu süreçlerime şahit olan canım arkadaşlarım, Beykent Üniversitesinin değerli öğretim elemanları Öğr. Gör. Nisa Nur DUMAN ve Öğr. Gör. Rabia OĞUZ KABAYEL'e,

Maddi manevi benden hiçbir desteğini esirgemeyen, bir telefonumda yanıma koşan, evladımı gözünden sakınmayan, ben kariyer için gece gündüz çalışırken evladımı bu yaşına getiren ailemin değerli üyeleri annem Ayşen ÖZKASAP, annem Ayşe ŞENTÜRK ve babam Süleyman ÖZKASAP'a, kariyer yolunda beni her daim destekleyen, 13 yıldır hayatımın en önemli anlarına şahit olan, benimle birlikte histolojiyi öğrenen ve öğretecek duruma gelen hayat arkadaşım değerli eşim Murat ŞENTÜRK'e binlerce kez teşekkür ederim.

Tezimi, 35 haftalıkken karnımda tekmeleriyle bana yeterlilik sınavında yardım eden, doğduğunda bir yandan beslenip bir yandan alto ses tonu ve gaz şikâyetleriyle tez projeme katkıda bulunan, ilk 'ANNE' dediğinde içimin yağlarını eriten, attığım adımların ne kadar doğru olduğunu gösteren, büyüdükçe sohbetine doyamadığım, sevgisini kelimelerle ifade edemediğim, benim biriciğim, canım yavrum, hayatımın en değerli varlığı,

Ali Efe ŞENTÜRK'e atfediyorum.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---------------------------------------------|-----|
| KABUL VE ONAY SAYFASI..... | i |
| TEŞEKKÜR..... | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | vi |
| RESİMLER DİZİNİ..... | vii |
| TABLolar DİZİNİ | x |
| ÖZET..... | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Testisin Histolojik Yapısı | 4 |
| 2.1.1. Spermatogenez Süreci | 7 |
| 2.2. Spermatogenetik Döngü | 12 |
| 2.3. Hücre Çekirdeği (Nükleus)..... | 13 |
| 2.3.1. DNA Paketlenmesi | 14 |
| 2.4. Hücre Ölümü; Nekroz ve Apoptosis | 22 |
| 2.5.Sisplatin | 25 |
| 2.5.1. Sisplatinin testislere etkisi | 28 |
| 2.6. Kurkumin..... | 29 |
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM..... | 31 |
| 3.1. Deney Protokolü | 31 |
| 3.3. Işık Mikroskopik İnceleme..... | 35 |
| 3.3.1.Histometrik değişimler | 35 |
| 3.3.2. Histokimyasal İnceleme | 35 |
| 3.3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme..... | 36 |
| 3.3.3. TUNEL Yöntemi | 37 |
| 3.4. Elektron Mikroskopik İnceleme | 37 |
| 3.5. İstatistiksel Analizler | 38 |
| 4. BULGULAR | 39 |
| 4.2. Seminifer Tubulus Çapı..... | 41 |
| 4.2. Histokimyasal bulgular..... | 42 |

| | |
|----------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3. İmmunohistokimyasal bulgular | 49 |
| 4.4. Apoptotik hücre sayısı ve TUNEL pozitif tubul oranı | 56 |
| 4.2. Elektron Mikroskopik Bulgular | 62 |
| 5. TARTIŞMA | 76 |
| 5.1. Ağırlık Analizi ve Histometrik Değerlendirme | 76 |
| 5.2. Apoptozis ve Histokimyasal Değerlendirme | 77 |
| 5.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler | 80 |
| 5.4. Elektron Mikroskopik Bulgular | 82 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 83 |
| KAYNAKLAR | 86 |
| EKLER | 101 |
| ÖZGEÇMİŞ | 102 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------|
| H₂O₂ | : Hidrojen Peroksit |
| KMN | : Kurkumin |
| KMN-10 | : Kurkumin 10 günlük grup |
| KMN-15 | : Kurkumin 15 günlük grup |
| KMN-5 | : Kurkumin 5 günlük grup |
| Kontrol Mg | : Kontrol mısır yağı gavaj grubu |
| Kontrol Sf Mg | : Kontrol serum fizyolojik mısır yağı gavaj grubu |
| Kontrol Sf | : Kontrol serum fizyolojik grubu |
| MAPK | : Mitojen aktivasyonlu protein kinaz |
| NF-κB | : Nükleer faktör kappa B |
| PBS | : Phosphate-buffered saline |
| PRM | : Protamin |
| SİS KMN-10 | : Sisplatin Kurkumin 10 günlük grup |
| SİS KMN-15 | : Sisplatin Kurkumin 15 günlük grup |
| SİS KMN-5 | : Sisplatin Kurkumin 5 günlük grup |
| SİS | : Sisplatin |
| SİS-10 | : Sisplatin 10 günlük grup |
| SİS-15 | : Sisplatin 15 günlük grup |
| SİS-5 | : Sisplatin 5 günlük grup |
| TP, TNP | : Transisyon proteini |
| TNF- α | : Tümör Nekrosis Faktör α |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1: Testisin anatomik konumu | 4 |
| Şekil 2: Testisin anatomik yapısı | 5 |
| Şekil 3: Seminifer tübül yapısı | 5 |
| Şekil 4: Spermatogenetik hücreler | 6 |
| Şekil 5: Spermatogenez süreci | 8 |
| Şekil 6: Spermatositogenez süreci | 9 |
| Şekil 7: Hücre çekirdeğinin yapısı | 13 |
| Şekil 8: Karyoliz, piknoz ve karyoreksisin şematik görünümü | 14 |
| Şekil 9: Bir nükleozomun yapısı | 15 |
| Şekil 10: Nükleozomların bobin sarmalı (solenoid) yapıda organize olması | 16 |
| Şekil 11: Kromatinin kromozomal yapı halinde paketlenmesi | 16 |
| Şekil 12: Somatik histonların protaminlerle yer değiştirmesine geçişindeki önemli olayları vurgulayan diyagram. | 18 |
| Şekil 13: Memeli spermiyogenezinin evrelerinin şematik gösterimi. | 20 |
| Şekil 14: Lümene dökülmeden hemen önce yoğunlaşmış spermatide gelişen yuvarlak spermatidlerde histonların transisyon proteinleri ve protaminlerle değişimini gösteren diyagram | 21 |
| Şekil 15: Nekroz (solda) ve apoptozisin hücresel özellikleri | 25 |
| Şekil 16: Sisplatinin moleküler yapısı | 26 |
| Şekil 17: Sisplatin ile oluşan DNA etkileşim formları. | 27 |

RESİMLER DİZİNİ

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resim 1: Sıçana intraperitoneal ilaç uygulaması..... | 32 |
| Resim 2: Bir sıçana gavaj uygulaması..... | 32 |
| Resim 3: CO ₂ gazı ile ötenazi uygulaması. | 33 |
| Resim 4: Sakrifiye edilen sıçanlardan testis dokularının alınması. | 33 |
| Resim 5: Seminifer tubulus çap ölçümü..... | 41 |
| Resim 6: Kontrol sf mg grubundan bir hayvana ait VII. evre seminifer tübül kesiti..... | 44 |
| Resim 7: Kontrol sf mg grubundan bir hayvana ait XIV. evre seminifer tübül kesiti. .. | 44 |
| Resim 8: Sis-Kmn 10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. | 45 |
| Resim 9: Sis-Kmn 10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. | 45 |
| Resim 10: Sis-Kmn 10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. | 46 |
| Resim 11: Sis-kmn 15 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. | 46 |
| Resim 12: Sis-kmn 15 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. | 47 |
| Resim 13: Sis kmn-15 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. | 47 |
| Resim 14: Sis kmn-15 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. | 48 |
| Resim 15: Atrofik testis..... | 48 |
| Resim 16: SİS-5 deney grubundan bir hayvana ait XII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu..... | 50 |
| Resim 17: Kontrol grubundan bir hayvana ait XII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu..... | 50 |
| Resim 18: SİS-5 deney grubundan bir hayvana ait XIII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu..... | 52 |
| Resim 19: KMN-5 deney grubundan bir hayvana ait XIII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu..... | 52 |
| Resim 20: Kontrol grubundan bir hayvana ait XIII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu..... | 53 |
| Resim 21: SİS-5 deney grubundan bir hayvana ait XIV. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu..... | 55 |
| Resim 22: Kontrol grubundan bir hayvana ait XIV. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu..... | 55 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resim 23: SİS KMN-10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesitinde apoptotik hücreler..... | 58 |
| Resim 24: SİS KMN-10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesitinde apoptotik hücreler..... | 58 |
| Resim 25: SİS-10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesitinde apoptotik hücreler. | 59 |
| Resim 26: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait TUNEL pozitif seminifer tübüller. | 59 |
| Resim 27: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait apoptotik hücreler. | 60 |
| Resim 28: Kontrol Sf grubundan bir hayvana ait TUNEL negatif seminifer tübüller .. | 60 |
| Resim 29: Kontrol Sf grubundan bir hayvana ait apoptotik hücre. | 61 |
| Resim 30: Kontrol Mg grubundan bir hayvana ait apoptotik hücreler..... | 61 |
| Resim 31: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografı. | 63 |
| Resim 32: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografı. | 63 |
| Resim 33: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografı. | 64 |
| Resim 34: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografı. | 64 |
| Resim 35: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografı.. | 65 |
| Resim 36: SİS-15 deney grubuna ait testis elektron mikrografı.. | 67 |
| Resim 37: SİS-15 deney grubuna ait testis elektron mikrografı.. | 67 |
| Resim 38: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait adluminal kompartman elektron mikrografı..... | 68 |
| Resim 39: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait adluminal kompartman elektron mikrografı. | 68 |
| Resim 40: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait adluminal kompartman elektron mikrografı. | 69 |
| Resim 41: KMN-15 grubu bazal kompartmanda bulunan spermatogonyumun elektron mikrografı..... | 70 |
| Resim 42: KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı..... | 71 |
| Resim 43: KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı..... | 71 |
| Resim 44: KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı..... | 72 |
| Resim 45: KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı..... | 72 |
| Resim 46: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. | 73 |
| Resim 47: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı..... | 74 |
| Resim 48: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı..... | 74 |
| Resim 49: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı..... | 75 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Resim 50: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı..... | 75 |
|-------------------------------------------------------------------------|----|

TABLÖLAR DİZİNİ

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1: Deney Protokolü | 34 |
| Tablo 2: Johnsen kriterleri..... | 35 |
| Tablo 3: Deney başlangıcında vücut ağırlığı ortalamaları. | 39 |
| Tablo 4: Deney sonunda vücut ağırlığı ortalamaları. | 40 |
| Tablo 5: Sağ ve sol testis ağırlığı ortalamaları. | 40 |
| Tablo 6: Seminifer Tubulus Çapı..... | 41 |
| Tablo 7: Johnsen kriter puanlarının gruplar arası karşılaştırılması. | 43 |
| Tablo 8: XII. Evre pozitif ve negatif uzamış spermatid oranlarının gruplar arası karşılaştırılması. | 49 |
| Tablo 9: XIII. evre pozitif ve negatif uzamış spermatid oranlarının gruplar arası karşılaştırılması. | 51 |
| Tablo 10: XIV. evre pozitif ve negatif spermatid oranlarının gruplar arası karşılaştırılması. | 54 |
| Tablo 11: Kontrol ve deney gruplarında seminifer tubul başına düşen apoptotik hücre sayısı..... | 56 |
| Tablo 12: % TUNEL pozitif tubulus oranı..... | 57 |

ÖZET

SİSPLATİN UYGULANAN SIÇANLARIN TESTİSLERİNDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLER VE BU DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE KURKUMİNİN ETKİSİ

Şentürk Ş. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Doktora (Veteriner) Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2020.

Sisplatin birçok kanser türünü tedavi etmek için kullanılan etkili bir antineoplastik ilaçtır. Bu ilacın en çok bilinen yan etkisi infertilitedir. Zerdeçal olarak da adlandırılan kurkuminin antioksidan ve antitümör aktiviteleri bulunmaktadır. Bu çalışma, özellikle testis kanserlerinde bir kemoterapötik ilaç olarak kullanılan sisplatinin spermatogenetik seri hücrelerinde meydana getirdiği değişiklikler üzerine kurkuminin etkilerini araştırmak amacıyla tasarlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda Sprague Dawley soyuna ait sıçanlardan rasgele seçilerek kontrol, sisplatin, kurkumin ve kurkumin+sisplatin olmak üzere dört grup oluşturulmuş ve her grup üç alt gruba ayrılarak toplam 12 alt grup elde edilmiş, her alt grupta 3 adet olmak üzere toplam 36 adet sıçan kullanılmıştır. Sıçanlardan elde edilen testis dokuları histokimyasal, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik düzeyde değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarında sisplatin enjeksiyonuyla birlikte kurkumin verilen deney gruplarında apoptozis oranının anlamlı şekilde arttığı ve sisplatin verilen deney gruplarında XII, XIII ve XIV. evreye ait uzamış spermatidlerde DNA paketlenmesinde görevli protein olan transition-1 immunpozitivitesinin kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak arttığı görülmüştür. Hem ışık hem de elektron mikroskopik bulgular özellikle sisplatinle birlikte kurkumin verilen grupta yoğun dejenerasyon, vakuolizasyon, germ hücre kaybı ve spermatogenetik arrest gerçekleştiğini göstermiştir. Çalışmamızın sonuçları sisplatinin DNA paketlenmesi üzerinden infertilitede sorunlara yol açabileceğini ve sisplatin ile birlikte kullanılan kurkuminin koruyucu etkisinden çok olumsuz etkileri daha da şiddetlendirerek, hücreleri apoptozis ve nekroza sürüklediğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, DNA paketlenmesi, kurkumin, sisplatin, testis

ABSTRACT

CHANGES IN THE TESTES OF THE CISPLATIN APPLIED RATS AND THE EFFECT OF CURCUMIN ON THESE CHANGES

Senturk S. Aydin Adnan Menderes University Health Sciences Institute of Histology and Embryology (Veterinary) Program, PhD Thesis, Aydin, 2020.

Cisplatin is an effective antineoplastic drug which is used to treat many types of cancer.

The most common known side effect of this drug is infertility. Curcumin, also called turmeric, has antioxidant and antitumor activities. This study was designed to investigate the effects of curcumin on the changes in spermatogenetic serial cells caused by cisplatin, which is used as a chemotherapeutic drug especially in testicular cancers. For this purpose, randomly selected 36 Sprague Dawley rats were separated to 4 groups that of control, cisplatin, curcumin and curcumin+cisplatin and each group was separated to 3 subgroups, each of them have 3 rats, so total 12 subgroups were obtained. The testicular tissues obtained from rats were evaluated at histochemical, immunohistochemical and electron microscobic levels. In the results of this study, it is observed that the rate of apoptosis increased significantly in the experimental groups given curcumin together with cisplatin injection, and the transition-1 protein which is involved in DNA packaging in the elongated spermatids belonging to stages of XII, XIII an XIV, immunopositivity is increased statistically in the cisplatin-administered experimental groups compared to control groups. Both light and electron microscopic findings showed that intense degeneration, vacuolization, germ cell loss and spermatogenetic arrest occurred especially in the group given curcumin together with cisplatin. The results of our study showed that cisplatin can cause problems in infertility through DNA packaging and dragging cells to apoptosis and necrosis by exacerbating the negative effects rather than the protective effect of curcumin used together with cisplatin.

Keywords: Apoptosis, cisplatin, curcumin, DNA packaging, testes

1. GİRİŞ

Sisplatin (SİS) testis, mesane, ovaryum, serviks, endometriyum, akciğer, baş ve boyun solid tümörlerini tedavi etmek için kullanılan etkili antineoplastik DNA-alkilleyici ajandır (Colpi ve ark., 2004; Howell ve Shalet, 2005). Fakat bu ilacın üreme sistemi üzerindeki toksisitesini içeren deneysel antikanser çalışmaları sınırlıdır (Cherry ve ark., 2004).

SİS'in antikanser aktivitesinin altında yatan mekanizma tam olarak aydınlığa kavuşmamıştır, fakat birçok mekanizma üzerinden hücreleri öldüren SİS, SİS-DNA adduktları (yakınlaşması) oluşturan, DNA hasarına yol açan bir ajan olarak kabul edilmektedir (Wand ve Lippard, 2005). SİS-DNA adduktları; monofonksiyonel olarak guanine bağlanmış sisplatin, interstrand çapraz bağlar, sisplatin-guanin çapraz bağı, GpG-interstrand çapraz bağı, GpNpG-intrastrand çapraz bağı, ApG-intrastrand çapraz bağı olarak oluşturulabilir.

Kurkumin (KMN) zerdeçal olarak da bilinen hint safranı baharatında (*Curcuma longa*) bulunan sarı renkli bir pigmenttir. KMN; Kanser Kemoönleme Enstitüsü, Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) ve Amerika Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) tarafından üçüncü nesil kemoönleyici olarak kaydedilmiştir (Aggarwal ve ark., 2007). Hem *in vitro* hem de *in vivo* hayvan çalışmalarında, KMN'nin antitümör (Ströfer ve ark., 2011), antioksidan, antiartritik, antiamiyolid¹, anti-iskemik (Shukla ve ark., 2008) ve antiviral aktiviteleri (Mazumdar ve ark., 1995) gösterilmiştir. Ayrıca, monositler ve alveolar makrofajlar tarafından üretilen Tümör Nekrozis Faktör α (TNF- α)'yı da içeren birçok kemokin ve sitokinin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Chan, 1995; Abe ve ark., 1999). Cho ve ark., (2007), KMN TNF- α ile muamele edilmiş HaCaT hücrelerinde nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve mitojen aktivasyonlu protein kinaz (MAPK) yollarının inhibisyonu üzerinden büyümeyi durdurmuş ve anti-inflamatuar etki göstermiştir.

İlbey ve ark. (2009) KMN gibi bir antioksidan tarafından NF- κ B aktivasyonunun kaldırılmasının SİS ile oluşturulmuş testis hasarında etkili bir korunma yöntemi olduğunu göstermişlerdir. KMN bu ajanın oluşturduğu testis hasarında güçlü bir koruma etkisine sahiptir ve klinikte faydalı olabileceği öngörülmektedir. Baharuddin ve ark. (2015) küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) hücre hatları üzerinde yapmış oldukları çalışmada,

¹ Amiyolid denilen proteinlerin birikimleri neticesinde amiyolidoz denilen hastalık ortaya çıkar. Kongo kırmızısı boyası ile histokimyasal olarak görünür hale gelir. Bu proteinlerin oluşum ve birikimlerine karşı kurkuminin koruyucu etkisinin olduğu çalışmalarda gösterilmiştir.

kurkuminin sisplatin tarafından indüklenmiş metastatik inhibisyonu arttırdığını ve göçebe kanser kök hücresi (CSC) alt popülasyonu olan CD166++/EpCAM+ hücre hatlarında apoptozu çoğalttığını bulmuştur. Bu sonuç, kurkuminin tümörün ilerlemesini inhibe ettiğini ve metastazı azaltmak için kullanılan ortak kemoterapi için tamamlayıcı olabileceğini göstermiştir.

KMN hakkındaki bilgilerin genellikle hastalık modelleri üzerine yapılan araştırmalardan edinildiği görülmektedir (Aggarwal ve ark., 2007). KMN'nin birçok patolojik durumda testis dokusu üzerine koruyucu işlevleri bulunmaktadır (Giannessi ve ark., 2008; Ilbey ve ark., 2009; Verma ve ark., 2009; Wei ve ark., 2009). Bununla birlikte normal doku ve hücreler üzerindeki moleküler etkileri yeterince araştırılmamıştır. Kurkuminin insanlarda sperm hareketliliğini, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunu inhibe edebileceği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Naz 2011; Rithaporn ve ark., 2003).

DNA'nın somatik hücrelerde nükleozomlar tarafından paketlenmesi, çok daha küçük nükleusa sahip olan spermatozoon için yeterli değildir. Dolayısıyla spermatozoon kromatini spermiyogenez sırasında yeniden paketlenme sürecine girer. Paketlenme sürecinde somatik histonlar metilasyon, fosforilasyon, ve übikuitinasyon (ubiquitination) aşamalarından geçer. Bu aşamalardan sonra somatik histonlar testise özgü histon varyantlarıyla yer değiştirir, testise özgü histon varyantları yerini transisyon proteinlerine (TP) bırakır. Paketlenme sürecinin en son aşamasında ise TP yerini protamin proteinlerine bırakır ve kromatin protamin proteinleri tarafından paketlenerek bu süreç tamamlanır (Laskey ve ark., 1993; Miller ve ark., 2010).

Xiaoyu ve ark. (2012) yapmış oldukları çalışmalarında fare spermatidlerini histon asetilaz (HAT) inhibitörü olan KMN ile muamele etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları KMN'nin germ hücre hattı üzerindeki durdurucu etkisinin doza bağımlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, primer haploid spermatidlerin apoptozunun KMN muamelesinden sonra arttığı görülmüştür. Beklenildiği gibi, asetile olmuş histon seviyesi down regüle olmuştur. Ayrıca, spermatidlerde transkripsiyonun durdurduğu, kromatin bağımlı faktörlerin dinamiğinin bozulduğu görülmüştür.

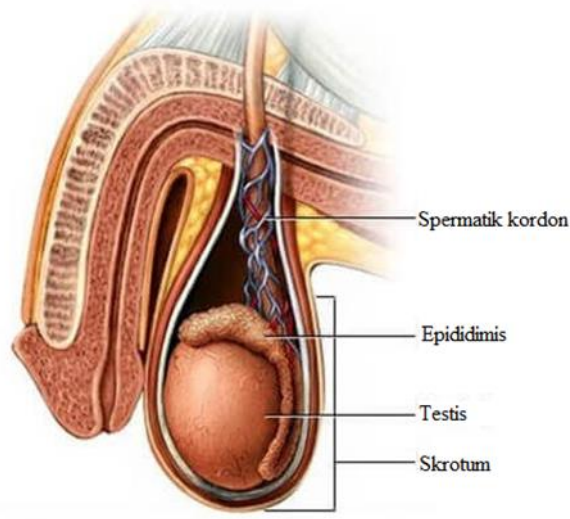
Tüm bu çalışmaların ışığında çalışmamızda bir kemoönleyici olan kurkuminin ve kanser tedavisinde etkili bir DNA-alkilleyici ajan olan sisplatinin özellikle spermatogenetik seri hücrelerindeki DNA yapısı ve spermiyogenez sırasında gerçekleşen DNA paketlenmesi

süreci üzerindeki etkilerinin histokimyasal, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

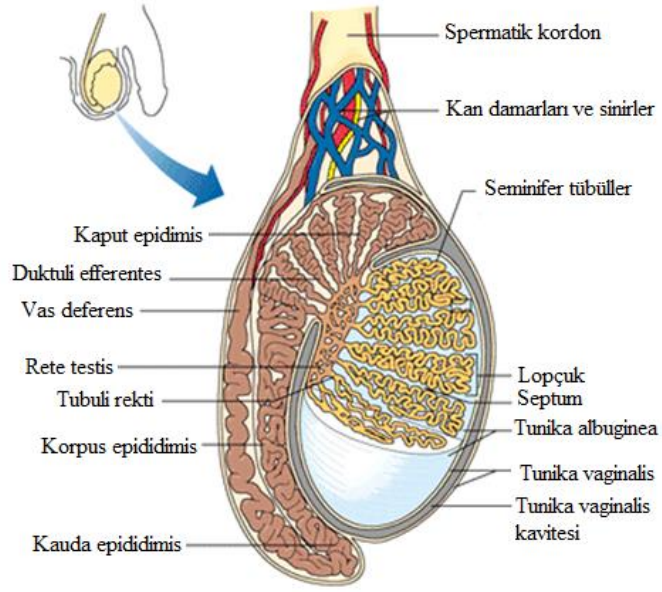
2.1. Testisin Histolojik Yapısı

Yetişkin testisleri vücut boşluğu dışında, skrotum içinde yer alan ovoid şekilli bir çift organdır. Olgun testisin posterior yüzü epididimis ile ilişkidir. Hem testis hem de epididimis skrotal kese içerisinde vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır (Şekil 1).

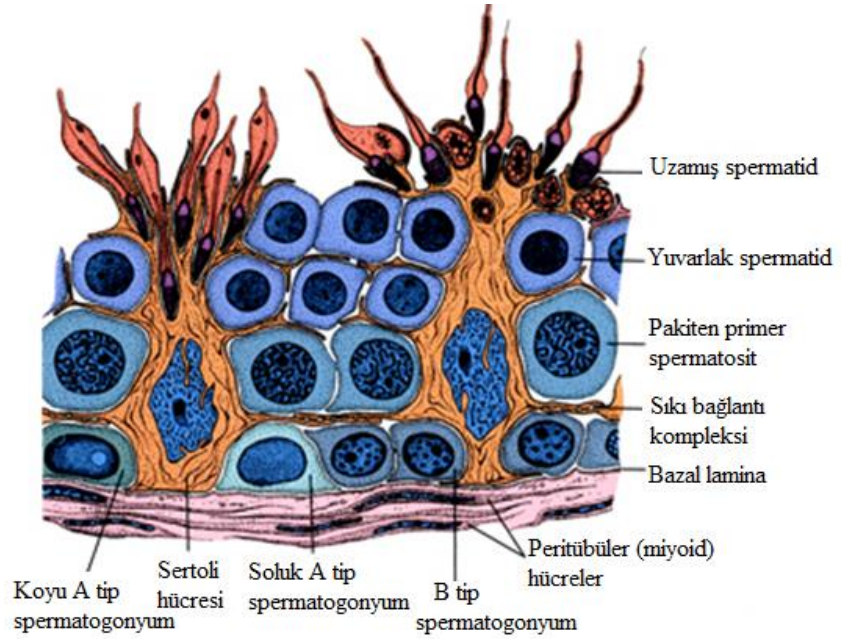


Şekil 1: Testisin anatomik konumu (Mayo Clinic (2018) internet sitesi).

Her bir testis tunika albuginea adı verilen kalın, yoğun bağ dokusu kapsülüyle sarılıdır. Her bir testis, kapsülden çıkıntı yapan, bağ dokusu septumu tarafından lopçuklara bölünür. Lopçuklar erkek üreme hücreleri olan olgun spermatozoonların üretildiği seminifer tübülleri ile Leydig ve interstisyel hücreleri içeren bağ dokusu stroma tabakasından oluşur (Şekil 2). Seminifer tübül iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümene sahiptir: Somatik Sertoli hücreleri ve spermatogenetik hücreler (Şekil 3) (Gartner ve Hiatt, 2007).



Şekil 2: Testisin anatomik yapısı (Marieb 2009).

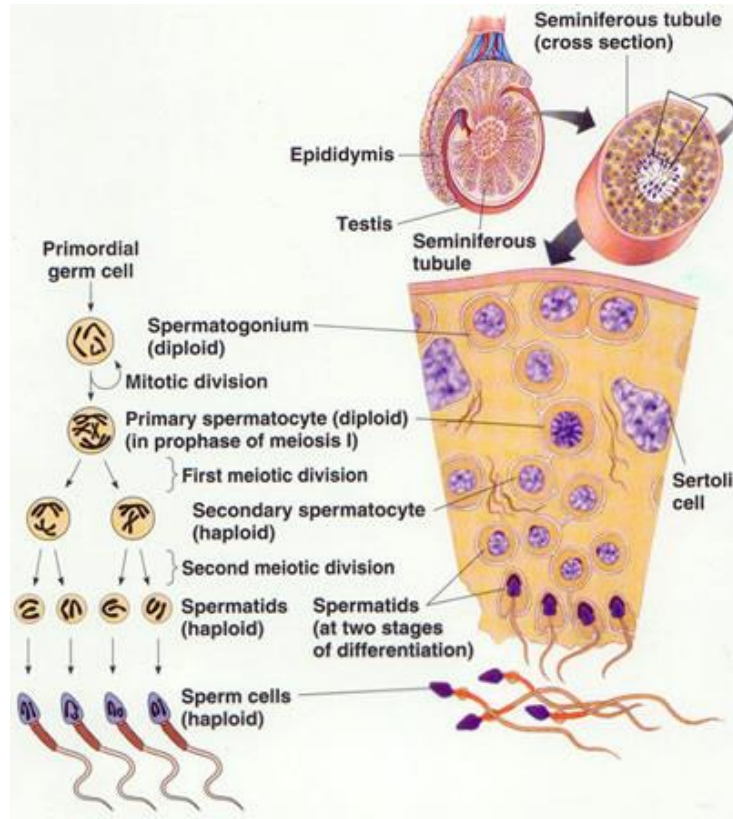


Şekil 3: Seminifer tübül yapısı (Junquera ve ark, 2003).

Sertoli Hücreleri, spermatogenetik hücrelerin desteklenmesi ve olgunlaşmasında çok önemli işlevlere sahip olan hücrelerdir. Bu hücreler ergenlikten sonra çoğalmaz. Ergenliğe kadar seminifer epitelyumun dominant hücre tipi olan Sertoli hücreleri, ergenlikten sonra seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Sertoli hücreleri bazal

membrandan seminifer tübül epiteline kadar uzanan, sınırları güçlükle ayırt edilen prizmatik hücrelerdir (Ovalle ve Nahirney, 2007).

Spermatogenetik hücreler, düzenli olarak çoğalan ve olgun spermatozoonlara farklılaşan hücrelerdir (Şekil 4). Bu hücreler, testisin erken gelişimi sırasında yolk kesesi içinde oluşan, gonad sırtlarında kolonize olan primordial germ hücrelerinden türer. Spermatogenetik hücreler, ileri gelişme evrelerinin zayıf tanımlanabilen tabakaları içinde, bitişiklerindeki Sertoli hücreleri arasında dizilirler. Bu hücrelerden bazal kompartmanda yerleşim gösterenler spermatogonyumlar; adluminal kompartmanda yerleşim gösterenler ise birincil spermatositler, ikincil spermatositler, spermatidler ve olgun spermatozoonlardır (Gartner ve Hiatt, 2007).



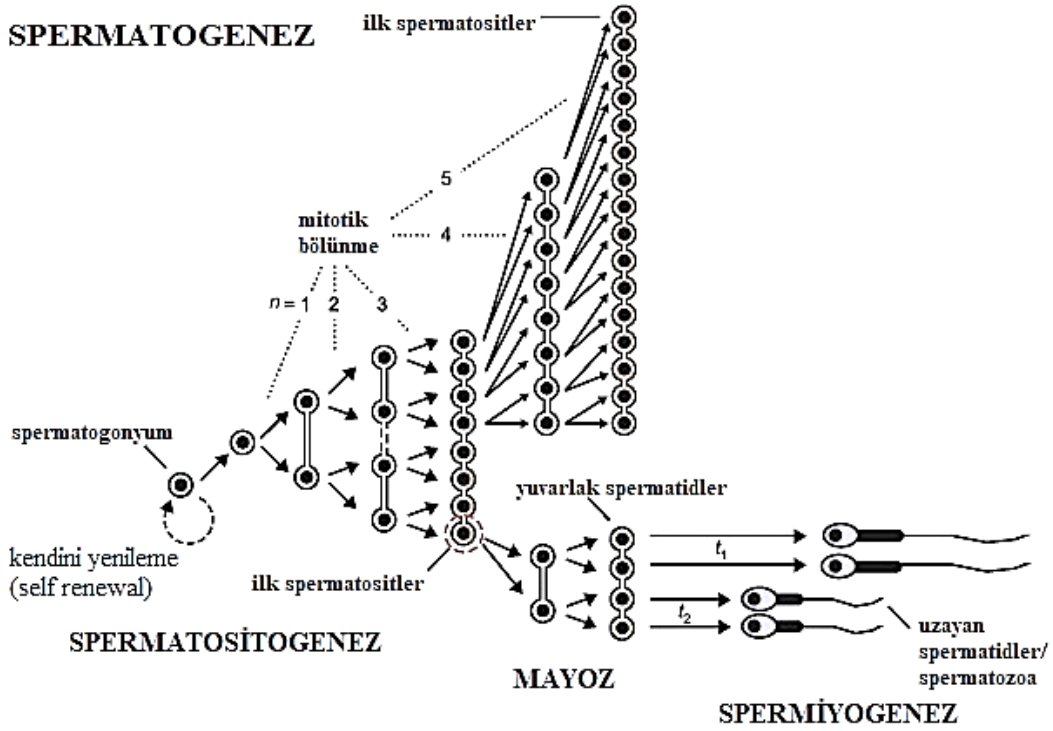
Şekil 4: Spermatogenetik hücreler (Lamkin J, 2011).

Spermatogonyumlar, bazal kompartmanda bazal lamina ile doğrudan ilişkide olan spermatogenetik hücrelerdir. Bunlar, çapı yaklaşık 12 μm olan; nispeten büyük, yuvarlak bir çekirdeği bulunan ve en az olgunlaşmış grubu oluşturan diploid ($2n$) kök hücrelerdir. Birçok mitotik bölünmeye uğrayarak bazaldan adluminal kompartmana göç eden nispeten büyük çekirdeklere sahip ‘Birincil spermatositleri’ oluştururlar. Birincil spermatositler, ilk mayoz bölünmeyi geçirdikten sonra ‘İkincil spermatositleri’; ikincil spermatositler ise DNA

replikasyonunu geçirmeden ikinci mayoz bölünmeye girerek ‘Spermatid’leri oluştururlar. Yuvarlak spermatidler, yaklaşık 9 µm çapında, haploid (n) kromozom sayısına ve DNA içeriğine sahip; akrozomal sistemin oluşmadığı veya yeni oluşmaya başladığı hücrelerdir. Uzayan spermatidler; spermatid başının oval şekil aldığı, henüz bir spermatozoon yapısına sahip olmayan germ hücreleridir. Uzamış spermatidler ise spermatozoon yapısını almış olan, başın uzadığı ve kuyruğun oluştuğı hücrelerdir. Bu spermatid cinslerine seminifer tübüllerin farklı evrelerinde rastlanır. Spermatidler lümene doğru yol alırken şekilleri uzar ve spermiyogenez adı verilen, mitoz bölünmenin gerekleşmediğı karmaşık bir olgunlaşma işleminden geçer. Bu olgunlaşma süreci sonunda olgun ‘Spermatozoon’lar oluşur (Gartner ve Hiatt, 2007).

2.1.1. Spermatogenez Süreci

Diploid spermatogonyumların haploid olgun spermatozoonları oluşturduğu süreç spermatogenez süreci olarak adlandırılır (şekil 5). Bu süreç Spermatositogenez, Mayoz ve Spermiyogenez olmak üzere üç fazdan oluşur. Spermatogonyumların birincil spermatositlere dönüşmesi spermatositogenez; diploid birincil spermatositlerin kromozomlarını indirgeyerek haploid spermatidleri oluşturması mayoz; ve spermatidlerin olgun spermatozoonlara farklılaşması spermiyogenez olarak tanımlanır (Gartner ve Hiatt, 2007).



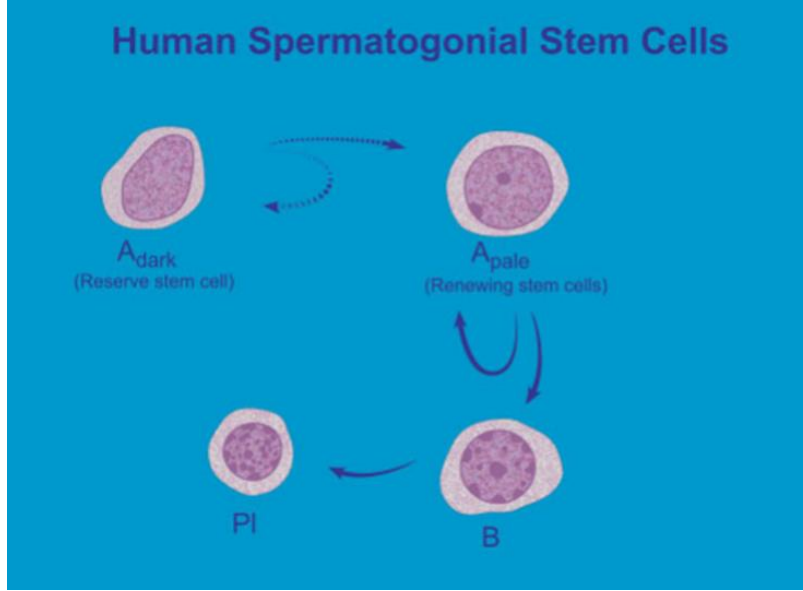
Şekil 5: Spermatogenez süreci (Ramm ve Scharer, 2014)

2.1.1.1. Spermatogonyumun Farklılaşması: Spermatisitogenez

Spermatogonyumlar seminifer tübülün bazal kompartmanında yerleşim gösteren küçük, diploid hücrelerdir. Bu hücreler bazal lamina üzerinde bulunur; ve ergenliği takiben, hücre döngüsüne girmek için testosterondan etkilenmeye başlar. Spermatogonyumların üç sınıfı vardır:

Koyu A tipi spermatogonyum; 12 μm çapında, kubbe biçimli küçük hücrelerdir. Yassı, yoğun heterokromatinli oval çekirdekleri vardır. Bu hücreler hücre döngüsüne girmemiş fakat girebilen kaynak kök hücrelerdir. Mitoza uğradıklarında, koyu A tipi spermatogonyum ile birlikte soluk A tipi spermatogonyumları oluştururlar. Soluk A tipi spermatogonyum; soluk bir görünüm veren çekirdeklerinin yoğun ökromatine sahip olması haricinde koyu A tipi spermatogonyumlara benzerler. Soluk A tip spermatogonyumlar birkaç tane organel;- sınırlı Golgi kompleksi, birkaç tane ribozomlu endoplazmik retikulum (RER) ve çok sayıda serbest ribozom içerirler. Bu hücreler testosteron tarafından uyarılarak mitoz bölünme ile diğer soluk A tipi spermatogonyum ve B tipi spermatogonyumları meydana getirirler.

B tipi spermatogonyumlar soluk A tipi spermatogonyumlara benzerler; fakat çekirdekleri yassıdan ziyade yuvarlaktır. Bu hücreler mitoz bölünmeyle diploid birincil spermatositleri oluştururlar (Şekil 6) (Ovalle ve Nahirney, 2007).



Şekil 6: Spermatositogenez süreci. Human spermatogonial stem cells: İnsan spermatogonyal kök hücreler, Adark (reserve stem cell): Koyu A tip spermatogonyum (kaynak kök hücre), Apale (renewing stem cells): Soluk A tip spermatogonyum (kök hücreyi yeniler), B: B tip spermatogonyum, Pl: preleptoten spermatosit (Golastaneh ve ark, 2009).

2.1.1.2. Spermatositlerin Mayoz Bölünmesi

Birincil spermatositler oluşur oluşmaz; bazal kompartmandan adluminal kompartmana göç eder. Bu hücreler Sertoli hücrelerinin yanına yerleştiği anda, Sertoli hücreleri ile zonula occludent adı verilen bağlantı yapılarını oluştururlar; böylece kan-testis bariyerinin bütünlüğünü korumaya yardımcı olurlar. Birincil spermatositler, seminifer epitelin en büyük hücreleridir. Bu hücrelerin, kondensasyonun birçok evresinde geniş vezikül görümlü çekirdekleri vardır. Oluşumlarından hemen sonra, 4n DNA içeriği elde etmek için DNA'larını iki katına çıkarırlar, fakat kromozom sayıları diploid kalır.

İlk mayoz bölünme sırasında, DNA içeriği her bir kardeş hücrede yarılanır (2n DNA), ve kromozom sayısı haploid olur. İkinci mayoz bölünme sırasında ise, her bir kardeş hücrenin DNA içeriği haploid olur (1n DNA), fakat kromozom sayısı haploid (n) olarak kalır.

İlk mayoz bölünmede I. profaz, 22 gün sürer ve leptoten, zigoten, pakiten, diyakinez olmak üzere 4 evreden oluşur. Leptoten evresi sırasında birincil spermatositin kromozomu yoğunlaşmaya, uzun iplikler oluşturmaya başlar, zigoten sırasında ise homologlarıyla çiftler

oluşturur. Pakiten evresinde kondensasyon, tetrad olarak tanınabilen kısa, kalın kromozomlar oluşturur. Diyakinez sırasında homolog kromozomların parça değişimi meydana gelir.

I. metafaz süreci esnasında çiftleşmiş homolog kromozomlar ekvator eksenine dizilirler. I. anafaz sırasında ise her çift ayrılarak hücrenin zıt kutuplarına doğru göç eder. Son olarak I. telofaz sırasında kardeş hücreler iki adet ikincil spermatositleri oluşturmak üzere ayrılırlar.

Homolog kromozomlar anafaz sırasında ayrılır. Bu ayrılma neticesinde X ve Y kromozomları sekonder spermatositlere paylaştırılır. Sekonder spermatositler ise ileride bu kromozomları ayrı ayrı taşıyan spermatozoonları oluşturur. Bu yüzden, ileride oluşacak embriyonun kromozomal (genetik) cinsiyetini belirleyecek olan spermatozoondur.

Sekonder spermatositler kısa ömürlü olduğu için, nispeten daha küçük hücrelerdir. Seminifer tübülde kolayca görünmezler. 2n DNA'yı içeren bu hücrelerin kromozomları replike olmaz; 2 adet haploid spermatid oluşturarak hızlıca ikinci mayoz bölünmeye girerler.

Spermatogonyumun mitoz bölünmesi ve spermatositlerin mayoz bölünmesi sırasında çekirdek bölünmesi; farklı bir sitokineze eşlik eder. Her bir hücre iki hücre oluşturmak üzere bölündüğünde, birbirine bağlanan yeni oluşmuş hücreleri tutan sitoplazmik köprü aralarında kalır. Bu tamamlanmamış bölünme birçok mitoz ve mayoz bölünme sırasında meydana gelir ve birbirine bağlı spermatidler hücre sinsisyumunu oluşturur. Bu bağlantı; spermatogenetik hücrelerin birbiriyle iletişimini ve aktivitelerinin eş zamanlı olmasını sağlar (Gartner ve Hiatt, 2007).

2.1.1.3. Spermatidlerin Farklılaşması: Spermiyogenez

Spermatidler, 8 µm çapında küçük, yuvarlak hücrelerdir. Soluk A tipi spermatogonyumların nesli olan tüm spermatidler birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlıdır. Küçük salkımlar oluşturur ve seminifer tübül lümenini işgal ederler. Bu hücrelerin bol miktarda RER, çok mitokondri ve iyi gelişmiş Golgi kompleksleri vardır. Spermatozoaya farklılaşmaları sırasında, hidrolitik enzimlerini biriktirir; organellerini yeniden düzenler ve sayılarını azaltır; flagella ve onunla ilişkili iskelet elemanlarını oluşturur ve sitoplazmalarının bir kısmını geride bırakırlar. Bu farklılaşma olaylarını içeren spermiyogenez süreci; Golgi, Kep, Akrozom, Olgunlaşma olmak üzere başlıca dört fazdan oluşur (Ovalle ve Nahirney, 2007).

Spermiyogenezin Golgi fazı sırasında, hidrolitik enzimler RER'de oluşur; Golgi aygıtında değişime uğrar ve küçük, membrana bağlı preakrozomal granüller olarak trans Golgi ağı tarafından paketlenir. Bu küçük veziküller birbirleriyle kaynaşarak akrozomal vezikülü oluştururlar. Bu vezikülün içindeki hidrolitik enzimler elektron mikroskobunda akrozomal granül olarak bilinen elektron yoğun bölge olarak görünür. Gelişmekte olan spermatozoonun anterior kutbunu oluşturmakta olduğu için akrozomal granül çekirdek zarıyla iletişime katılır ve çekirdek zarına bağlı hale gelir. Akrozomal vezikül oluşurken, sentriyoller çekirdeğin yakınından ayrılır ve bir tanesi flagellar aksonemin oluşumuna katılır. Sentriyoller, sentriyolleri çevreleyen yapı olan bağlantı parçasının oluşumuna yardım etmek için çekirdeğin yakınına geri dönerler. Spermiyogenezin kep fazı sırasında, akrozom vezikülünün hacmi artar. Bu vezikül son hacmine genişledikçe, akrozom olarak bilinen yapıya dönüşür. Akrozom fazı sırasında, spermatidin morfolojisinde birçok değişim gerçekleşir. Çekirdek yoğunlaşır, hücre uzar ve mitokondri yer değiştirir. Kromozomlar sıkıca yoğunlaşır ve paketlenir. Kromozomal hacim düştükçe, tüm çekirdeğin hacmi de düşer. Ek olarak, çekirdek yassılaşır ve özgün görünümüne kavuşur. Mikrotübüller spermatidin uzamasına yardım eden silindirik yapı olan manşeti oluşturmak üzere bir araya gelirler. Uzamakta olan sitoplazma, flagellar aksonemin mikrotübüllerine eriştikçe, manşet mikrotübülleri ayrılır. Manşet mikrotübüllerinin yerini spermatozoonun orta kısmı ile baş kısmının bağlantısının şeklini çizen elektron yoğun bölge olan annulus devralır. Mitokondri kılıfı, spermatozoonun kuyruğunun orta kısmında aksonemin etrafını şekillendirir. Mitokondri kılıfı oluşumu ve spermatidin uzaması sırasında, dıştaki yoğun liflerin 9 sütunu aksonemin etrafını oluşturur. Bu yoğun lifler, Golgi fazı sırasında oluşan bağlantı parçasına tutunur. Oluşumlarından sonra, yoğun lifler, fibröz kılıf olarak bilinen bir grup yüzük biçimli, yoğun yapılar tarafından çevrilir. Olgunlaşma fazı, spermatid sitoplazmasının dökülmesidir. Sitoplazmanın fazlası atıldıkça, sinsisyum bozulur ve bireysel spermatozoon geniş hücre kütesinden kurtulur. Sitoplazmik atıklar, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve serbest kalan spermatozoon seminifer tübülün lümenine atılır (spermiasyon). Yeni oluşmuş spermatozoonun hareketsiz olduğu ve bir oositi döleyemeyeceği bilinmelidir. Spermatozoon epididimisten geçerken hareketlilik kazanır. Sadece dişi üreme sistemine giren spermatozoon kapasite olur (Gartner ve Hiatt, 2007; Ovalle ve Nahirney, 2007).

2.2. Spermatogenetik Döngü

Spermatogenetik hücreler seminifer tübülde hücresel ilişkiler halinde organize olurlar. Seminifer epitelin belirli bir bölgesinde, farklılaşmalarını tamamlanmakta olan spermatidler, spermatositler ve spermatogonyumlar ile özel kombinasyonlar şeklinde görülebilir. Bu hücresel gruplaşmalar seminifer tübülün belirli bir bölgesinde ardışık olarak takip eder ve bu dizi döngüsel olarak kendini yineler.

Belirgin bir seminifer tübül alanında, aynı hücresel gruplaşmanın, iki defa ortaya çıkması arasında ardışık basamakların serisi, spermatogenetik döngü olarak tanımlanır. Spermatogenezisin tanımlanması için gerekli olan, bir spermatogenetik döngü içindeki evre sayıları ve döngü sayısı türler arasında farklılık gösterir. Sıçanlarda bir spermatogenetik döngü 14 evreye ayrılırken (Leblond ve Clermont, 1952), farelerde 12 evreye ayrılmaktadır (Oakberg 1956). Sıçanlarda bir döngünün tamamlanması 12 gün sürerken, farelerde bu süre 8.45 gündür. Bir spermatogonyumdan spermatozoa oluşumu için 4 döngüye (sıçan:48gün, fare:33 gün) gerek vardır. Boğalarda bu döngü 8 evreden oluşurken, spermatogenezisin tamamlanması 61 gün sürmektedir (Staub ve Johnson, 2018). İnsanlarda ise bir döngünün 6 evresi görülür. Spermatogenezisin tamamlanması ise 64 gün sürer (O'donnell ve ark, 2006).

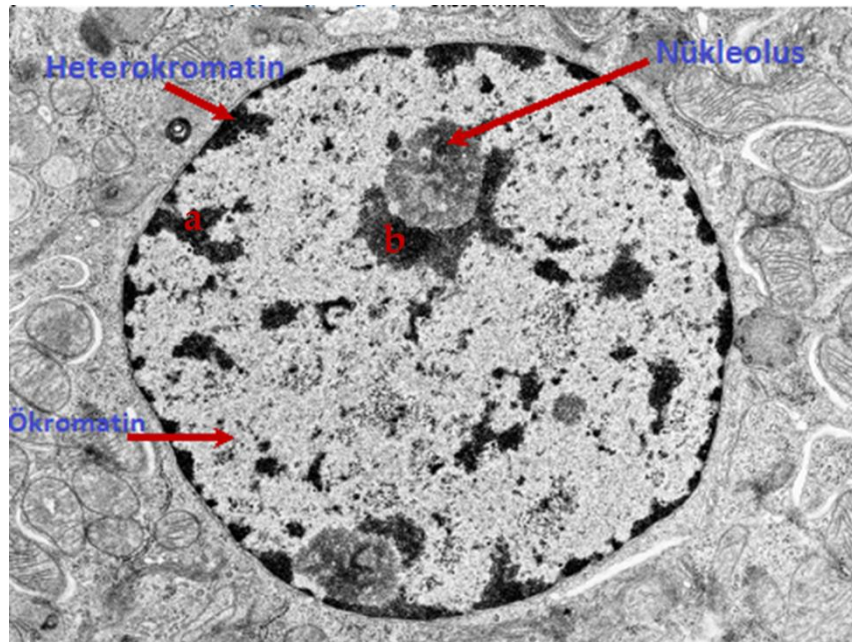
Spermatogenetik döngü evrelerinin sınıflandırılması için, spermatid çekirdeğinin (çekirdek çaplarının) ve akrozomun morfolojik özellikleri ile hücrede mitotik figürlerin bulunması veya bulunmaması gibi özellikler göz önüne alınır (Hess ve ark, 1990). Testis içinde bu evreler, seminifer tubullerin uzunluğu boyunca birbirini takip eden düzen içinde tekrar dizilir. İnsan testisinde spermatogenetik hücre nesilleri sarmal düzende organize olmuşlardır. Bir seminifer tübül kesiti sıçan testisindeki tek basamak yerine üç veya dört hücresel gruplaşmayı (basamağı) içerir. İnsanda bir döngünün süresi 16 gündür. Dört döngü sonunda (64gün) spermatogonyumlar testiküler sperm haline gelir.

Sıçanlarda seminifer tübüllerde 14 evre bulunur. Spermatogenez sürecinin farklı aşamalarının gerçekleştiği bu evrelerde B tipi spermatogonyumların preleptoten spermatositlere bölünmesiyle I. mayoz bölünme VI. evrede başlamış olur. Spermatosit hücreleri mayoz bölünmenin çeşitli aşamalarından geçerek XIV. evrede II. mayozu bitirir ve sekonder spermatositlere dönüşürler. Bu aşamadan sonra sekonder spermatositler yuvarlak spermatidlere dönüşür ve spermiyogenez sürecine girerler. VII. evrede olgun bir spermatozoon oluşarak VIII. evrede lümene serbestlenir. Sıçanlardaki bu spermatogenetik döngü 12 günde bir gerçekleşir (Russell 1991).

2.3. Hücre Çekirdeği (Nükleus)

Çekirdek, ökaryotik hücrelerde genomu (genetik bilgi) içeren membranla sınırlandırılmış bir bölgedir (Şekil 7). Genetik bilgi ile birlikte DNA replikasyonu, RNA transkripsiyonu ve işleme mekanizması da burada gerçekleşmektedir. İnterfaz hücresi olarak da adlandırılan bölünmeyen bir hücrenin çekirdeği aşağıdaki bileşenlerden oluşmaktadır.

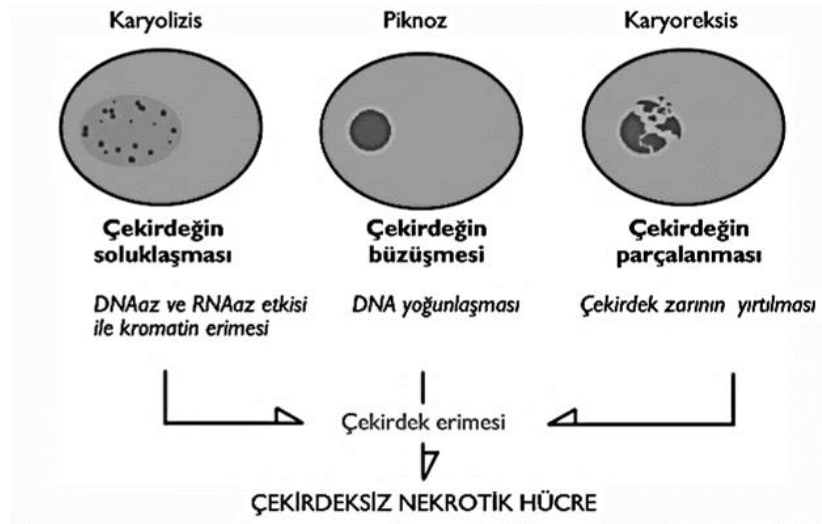
- Kromatin, ökromatin ya da heterokromatin olarak organize olmuş çekirdek materyalidir. DNA'yı ya da DNA'nın işlev görmesi için gerekli, yaklaşık olarak eşit kütledeki çekirdek proteinleri (ör; histonlar) içermektedir.
- Çekirdekçik (nükleolus), çekirdek içerisinde transkripsiyonel olarak aktif ribozomal RNA (rRNA) genleri şeklindeki DNA'yı RNA'yı ve proteinleri içeren küçük bir alandır. Çekirdekçik rRNA sentezinin yapıldığı alandır ve düzenleyici hücre döngüsü (siklus) proteinlerini içermektedir.
- Çekirdek zarfı; hücrenin çekirdeğini saran bir membran sistemidir. Perinükleolar sisternal alan tarafından ayrılan iç ve dış membrandan oluşmaktadır ve çekirdek porları tarafından delinmiştir. Çekirdek zarfının dış membranı granüllü endoplazmik retikulum (gER) membranı ile devamlılık gösterir ve sıklıkla üzerinde yer yer ribozomlar içermektedir.
- Nükleoplazma; kromatin ve nükleolus dışında geriye kalan çekirdek içeriğidir.



Şekil 7: Hücre çekirdeğinin yapısı. a: Perinükleolar kromatin; b: Perinükleolar kromatin (Yale Üniversitesi (2020) internet sitesi).

Çekirdeğin basit mikroskopik değerlendirmesi, hücrenin iyiliği konusunda çok miktarda bilgi sağlar. Çekirdeğin boyutu, şekli ve yapısının değerlendirilmesi, tümör tanısında önemli rol oynamaktadır. Örneğin ölmekte olan hücreler gözle görülür çekirdek farklılıkları sergilerler. Bunlar arasında aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- Artan DNAaz aktivitesi nedeniyle DNA'nın tamamen erimesi sonucu çekirdeğin yok olması ya da **karyoliz**,
- Çekirdeklerin büzüşmelerine (yoğun bazofilik kütleler halinde görünürler) yol açan **piknoz** ya da kromatinin yoğunlaşması ve
- **Karyoreksis** ya da çekirdeklerin parçalara ayrılması (bu değişiklikleri genellikle piknoz takip eder.) (Şekil 8) (Ross ve Pawlina, 2011).

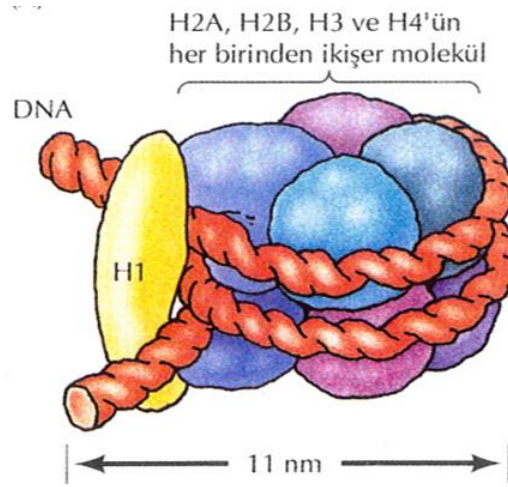


Şekil 8: Karyoliz, piknoz ve karyoreksisin şematik görünümü (Özdamar ve ark, 2011).

2.3.1. DNA Paketlenmesi

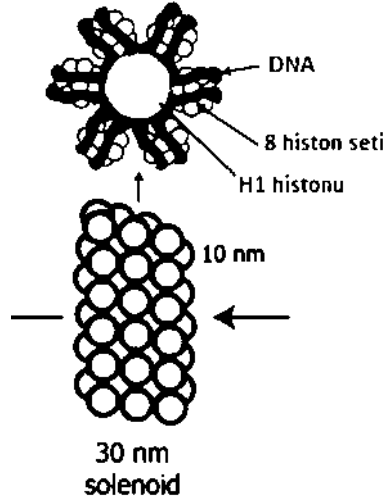
Kromatin, çift zincirli DNA iplikçığı ve proteinlerden oluşmaktadır. Kromatini oluşturan temel proteinler, negatif yüklü DNA molekülüne bağlanmayı kolaylaştıran bazik aminoasitleri (arjinin ve lizin) yüksek oranda bulunduran histonlar ve asidik yapıdaki non-histon proteinlerdir. Histonlar ve non-histon proteinler DNA ve RNA sentezinde enzim olarak, DNA'nın hücre çekirdeğinde düzenlenmesinde yapısal protein olarak görev alır. Non-histon proteinler hücrede çok az miktarda ama çok çeşitli sayıda bulunmasına rağmen, histon proteinlerinin toplam kütleleri, hücre DNA'sının toplam kütlesine eşittir ve H1, H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere 5 tipi vardır.

DNA iplikçığının histonlar üzerine sarılmasıyla oluşan makromoleküle nükleozom adı verilir. Nükleozomlar hem ökromatin hem de heterokromatinde ve kromozomlarda bulunmaktadır. Bu 10 nm çaplı partiküller, kromatin katlanmasının ilk seviyesini temsil eder. Her nükleozom sekizli histon merkezi ve bu histon merkezini çeviren yaklaşık iki tur dönen DNA'dan (yaklaşık 146 nükleotid çifti) oluşur. Sekizli histon, her biri H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarından oluşan iki molekül içerir. H1 histonu sekiz molekülün etrafında paketlenmiş olan DNA molekülü ile çapraz bağ yapar (Şekil 9). Kromatin nükleustan izole edildiğinde, kromatinin nükleozom yapısı transmisyon elektron mikroskopide (TEM) ile görülebilir ve genellikle “boncuk dizisi” olarak tanımlanır.



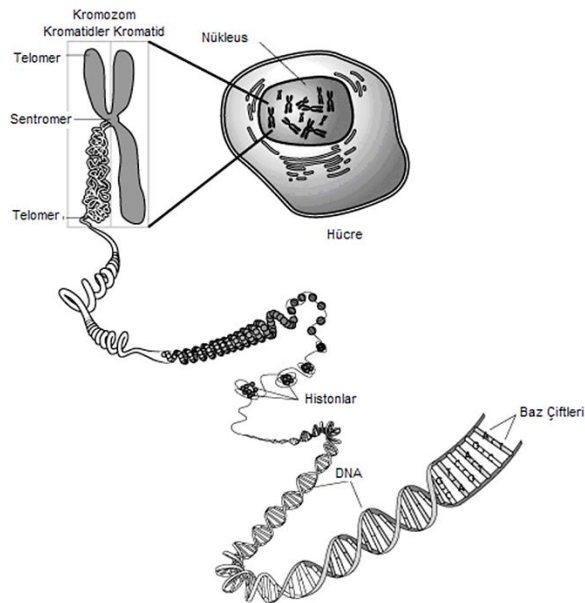
Şekil 9: Bir nükleozomun yapısı (Luger ve ark, 1997).

Memeli hücresinde DNA yaklaşık 2 m'lik bir uzunluğa sahiptir. Oysa çekirdeğin çapı yaklaşık 10 μm 'dir. Bir DNA molekülünün nükleozomları oluşturması ile uzunluğunda yaklaşık 7 katlık bir kısalma oluşur ve uzunluğu 90 mm'ye iner. Bu kısaltmaya rağmen DNA'nın çekirdek içine sığabilmesi mümkün değildir. Bu nedenle nükleozom zincirleri dönüş başına 6 nükleozom içeren bir bobin sarmalı (solenoid) oluşturarak 30 nm'lik yoğun kromatin fibrillerine dönüşür (Şekil 10). Bu fibriller, daha ileri organizasyon ile halka bölgeleri (*İng. Loop domains*) (15.000-100.000 baz çifti içerir.) oluştururlar ve bunlar da histon olmayan proteinlerden oluşan kromozom iskeletine ya da çekirdek matrikse tutunarak sabitlenirler. Heterokromatinde kromatin fiberleri sıkıca paketlenmiş ve birbirleri üzerine katlanmışlardır; ökromatinde kromatin fibrilleri daha gevşek düzenlenmişlerdir (Akay, 2012).



Şekil 10: Nükleozomların bobin sarmalı (solenoid) yapıda organize olması.

Kromozomlar hücre döngüsünün S fazında DNA replikasyonu sonucu hücredeki DNA miktarının iki katına çıkması ve profazın başlangıcında kromatin ipliklerinin kısalıp kalınlaşmasıyla oluşan yoğunlaşmış kromatindir (Şekil 11). Her kromozom sentromer adı verilen bir noktada birbirine bağlı iki kromatitten oluşmaktadır. Kromozomun her iki ucunda bulunan bölgelere telomer denir. Telomerler hücre bölünmesi ile kısalırlar. Son çalışmalar, telomer uzunluğunun hücre yaşam süresinin bir göstergesi olduğunu göstermiştir. Kromozom sayısı her tür için farklıdır. Vücut hücrelerinde bulunan kromozom sayısı ($2n$, diploit), eşey hücrelerinde bulunan kromozom sayısının (n , haploit) iki katıdır. İnsan vücut hücrelerinde 46 kromozom; eşey hücrelerinde 23 kromozom bulunur.



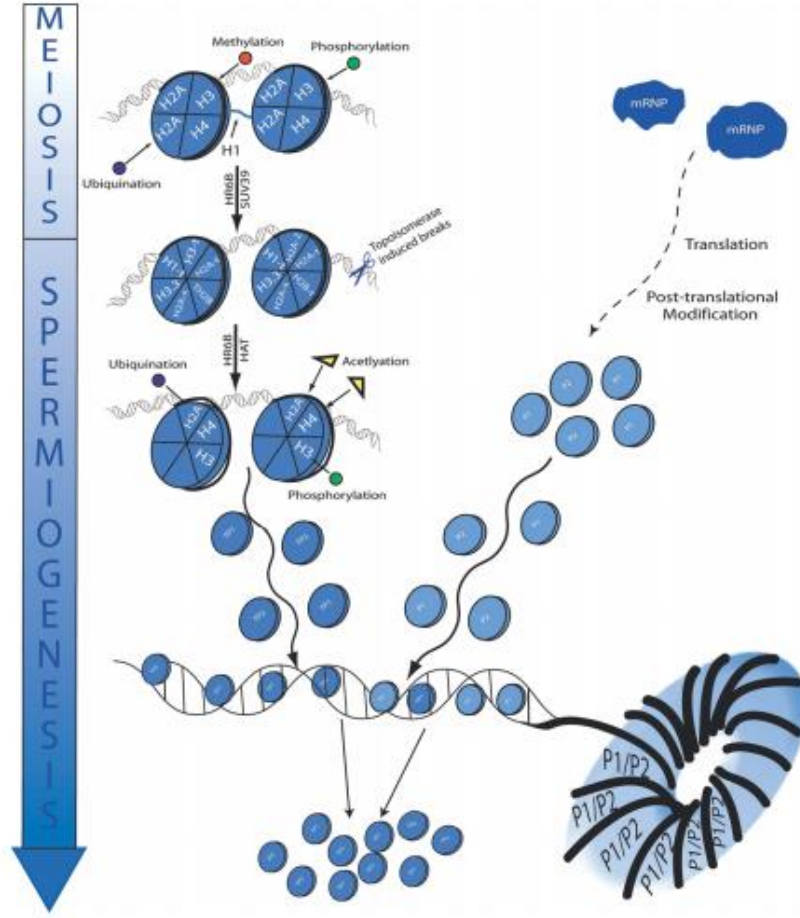
Şekil 11: Kromatinin kromozomal yapı halinde paketlenmesi (bioconductor.org, 2002)

2.3.1.1. Spermatozoonda DNA paketlenmesi

DNA'nın somatik hücrelerde nükleozomlar tarafından paketlenmesi, çok daha küçük çekirdeğe sahip olan spermatozoon için yeterli değildir. Dolayısıyla spermatozoon kromatini spermiyogenez sırasında yeniden paketlenme sürecine girer. Bu süreçte görevli proteinler olan protaminler; histonlar ve daha sonra transisyon (geçiş, aracı) proteinleri ile yer değiştirerek somatik DNA'nın sperm nükleusunda daha iyi bir şekilde yoğunlaşmasını sağlar (Kierszenbaum 2006; Le Lannic ve ark, 1993). Protaminler arjinin ve sisteinden zengin, yüksek oranda bazik, sperme özgü nükleer proteinlerdir. Yüksek oranda arjinin DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanma sağlar (Balhorn ve ark, 2000). Sistein kalıntıları ise kromatin paketlenmesinde gerekli olan çoklu inter ve intra-protamin disülfid bağlarının kurulmasını kolaylaştırır (Le Lannic ve ark, 1993; Szczygiel ve Ward, 2002). Protaminler, daha sıkı ve hidrodinamik bir nükleus oluşturmak için erkek genomunun yoğunlaşmasını sağlar (Oliva, 2006). İnsanlarda yaklaşık olarak eşit oranda (Prm1/Prm2 yaklaşık olarak 1) ifade edilen iki tip protamin vardır; Prm1, Prm2. Prm3 ise hala çalışılmaya devam etmektedir. TP1 ve TP2 ise histon-protamin sürecinde rol oynayan transisyon proteinleridir.

Somatik histonların testise özgü varyantları olan transisyon proteinlerle (TP) ve ardından protaminlerle (PRM) ardışık olarak değişimi düzgün şekilde yoğunlaşmış kromatine sahip spermatozoa üretimi için çok iyi düzenlenmesi gerekir. Birçok türde, sperm oluşumu histonların protaminlerle yer değişimini içerir (Ausio, 1999). Balıklar ve kuşlarda bu değişim direkt gerçekleşirken (Oliva ve Dixon, 1991) memeliler ve bazı deniz omurgalılarında (Wouter-Tyrou ve ark., 1998) histonlar ilk olarak TP1 ve TP2 adı verilen aracı nükleer proteinlerle yer değiştirir. Bu proteinler daha sonra protamin 1 ve sonrasında proteoliz ile olgun formuna dönüşen protamin 2 ile yer değiştirir (Chauviere ve ark., 1992). DNA paketlenmesi spermiyogenezin uzamış spermatid evresinde gerçekleşen özelleşmiş bir süreçtir. Paketlenme esnasında spermatid çekirdeğinde başlıca dört mekanizma gerçekleşir (Şekil 12).

1. Somatik histonlarda metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon (ubiquitination) modifikasyonları gerçekleşir.
2. Somatik histonlar asetilasyona uğrayarak testise özgü histon varyantlara dönüşür.
3. Histon varyantları transisyon proteinleri (TP1, TP2) ile yer değiştirir.
4. Transisyon proteinler protaminler ile yer değiştirir (Carrell ve ark, 2007).



Şekil 12: Somatik histonların protaminlerle yer değiştirmesine geçişindeki önemli olayları vurgulayan diyagram. Somatik histonlar, mayoz bölünme sırasında testise özgü histonlar (t) ile değiştirilmesini kolaylaştıran bölgeye özgü metilasyon, fosforilasyon ve ubikuitinasyon geçirir. H4-t'nin hiperasetilasyonu, testise özgü histonların transisyon proteinleri ile değiştirilmesini kolaylaştırmak için, topoizomerez 1'in sonradan yeniden bağlanan çift zincir kırılmalarında burulma stresini rahatlatmasına karşılık, DNA sarmalının rahatlamasında anahtar faktördür. RNP parçacıkları havuzundan işlenen protamin 1 ve 2, DNA'ya bağlanmadan ve bağlanma sırasında ve transisyon proteinleri ile değişimde olgunlaşmaya tabi tutulur. HR6B, ubikuitin-konjüge enzim E2B (UBE2B) (RAD6 homologu); HAT, histonasetiltransferaz; Suv39, H3 Lys 9 histon metiltransferaz (Carrell ve ark, 2007).

Kromatinin tekrar modellenmesi negatif süper sarmal olan nükleozomal DNA'nın süper sarmal olmayan duruma dönüşmesi (Ward ve ark., 1989), geçici DNA kırıklarıyla (McPherson ve Longo, 1993), ve kromatin kondensasyonu olan çekirdek şeklindeki değişimlerle gerçekleşir.

2.3.1.1.1. Histon modifikasyonları

Sperm DNA kondensasyonu sırasında histonların uğradığı modifikasyonlar ve bu modifikasyonların kazandırdığı avantajlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir (Carrell ve ark, 2007).

- a. Metilasyon:** Ökaryotik DNA'da metil grupları, sitozin birimlerine 5 pozisyonunda kolayca bağlanarak, 5-metilsitozin oluşturur (5-meC). Bu nedenle metilasyon, öncelikle CG zengin bölgelerde görülür. Uygun bir sinyal geldiğinde DNA'nın hemen açılmaması gerekir. O yüzden DNA metillenir. Metillenmeyi açan anahtar oositte gizlidir. Spermatozoon oosit içerisine girdiği zaman, ooplazmada, maternal faktörler paternal kromatin içine hızla girer; inter ve intra-protamin disülfid bağlarını çözer ve erkek pronükleus oluşmadan önce protaminler maternal histonlarla yer değiştirir. Spermin oositi fertilize ederek embriyoyu oluşturabilmesi için, bir yandan genlerinin sağlıklı biçimde eksprese olabilmesi gerekirken, diğer yandan da bazı genlerinin inhibisyonu gerekir. Genin inhibe edilmesi önemlidir, çünkü o gen eğer çalışırsa ürettiği faktör belki de spermatogenezde bazı basamakları baskılayacaktır (imprinting). İşte bir genin ekspresyonunun inhibe olabilmesi, bu genin sitozin bazına "metil grubunun" bağlanması ile gerçekleşir.
- b. Fosforilasyon:** Kromozomal kondensasyonu sağlar.
- c. Asetilasyon:** Testise özgü histon varyantlarının hiperasetilasyonu nükleozom ve DNA arasındaki bağı azaltır, kromatin gevşemesine sebep olur (Hong ve ark, 1993). Ayrıca zincir kırılmalarını teşvik eden topoizomeraşı aktifleştirir.
- d. Ubikuitinasyon:** Gen ekspresyonunda ve genom stabilitesinde önemli rollere sahiptir. Proteosomal bozulmaya direnç sağlar.

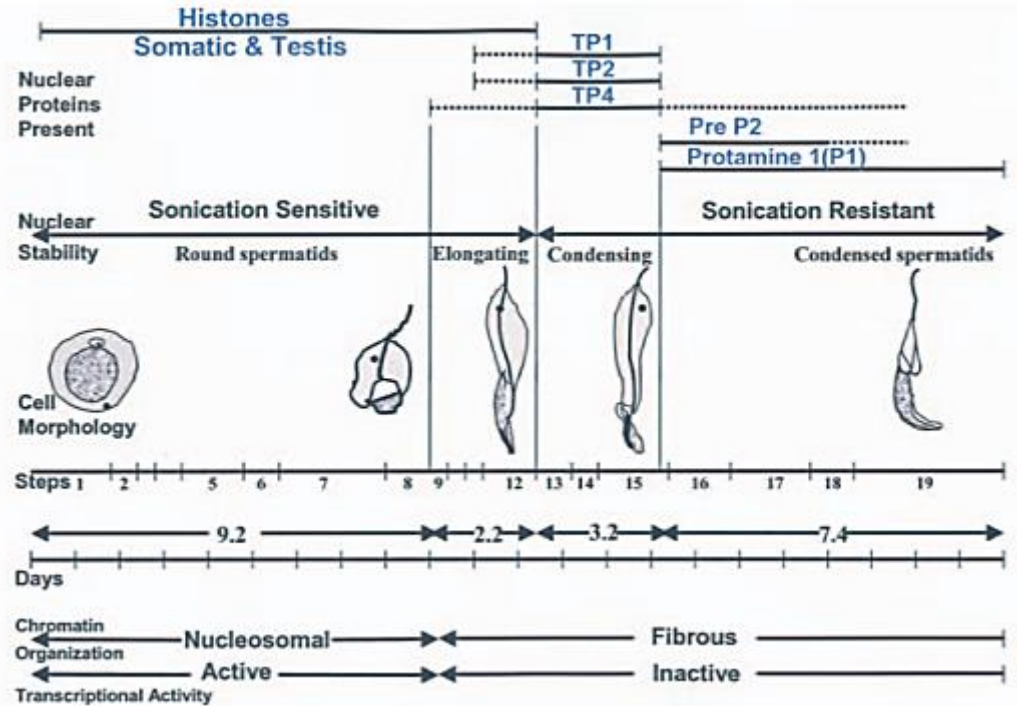
2.3.1.1.2. Transisyon Proteinleri

Kemirgenlerde, kromatin şekillenmesi %95 somatik histon proteinlerinin küçük bazik proteinler olan PRM'lerle yer değiştirmesiyle gerçekleşir. Disülfid bağların oluşmasıyla, PRM'ler üreme başarısı için zorunlu bir süreç olan sperm kromatin yoğunlaşmasına izin verirler (Balhorn ve ark, 2000). Bu dinamik süreç öz somatik histonlarının (H4 histon proteini hariç), testise özgü H2B (tH2B veya Hist 1h2ba) ve testise özgü (H1T2 ve H1FNT) H1 histon aile üyesi N ile yer değiştirdiği erken postmayotik germ hücreleri olan yuvarlak spermatidlerde başlatılır (Martianov ve ark, 2005). Uzayan spermatidlerde, testise özgü

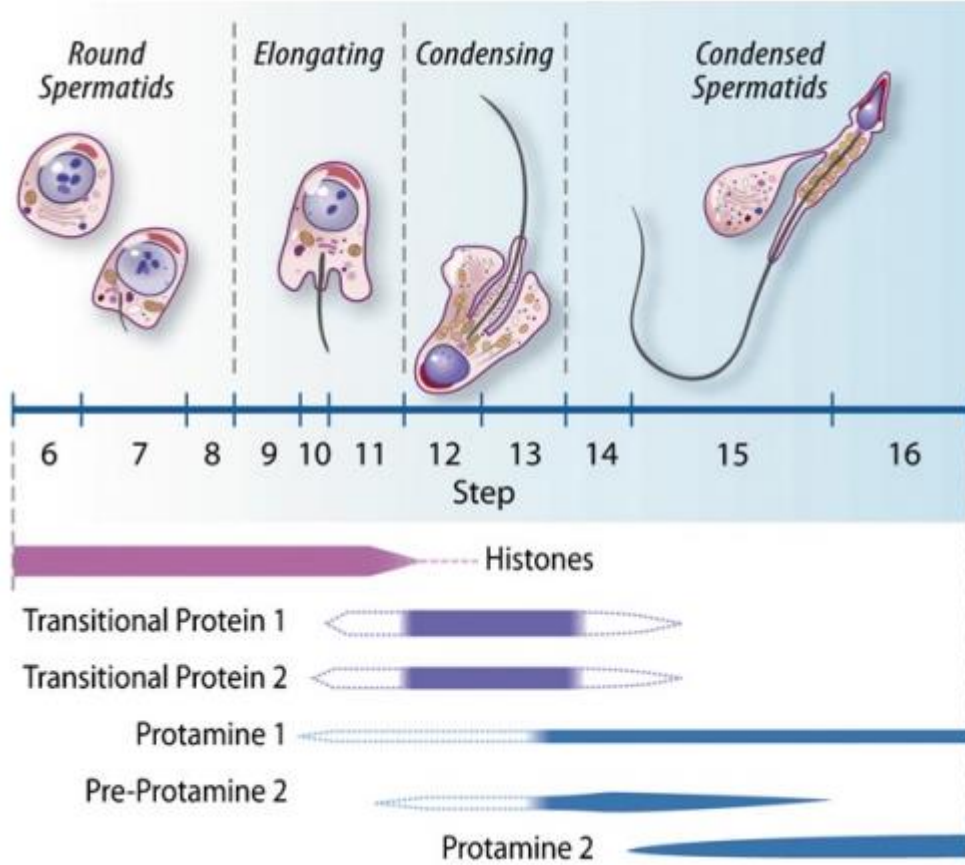
çeşitler küçük bazik transisyon proteinlerle (TP'ler) ve onlar da son olarak PRM'lerle yer değiştirir (Balhorn ve ark, 2000). Bilinen 4 adet TP (TP 1-TP 2-TP 3 ve TP 4) ve 2 adet PRM (PRM 1-PRM 2) vardır (Lanneau ve Loir, 1982; Meistrich ve ark, 1978; Balhorn, 2007). TP ve PRM genleri premayotik germ hücreleri olan pakiten spermatositlerde transkribe edilir ve yuvarlak spermatidlerde kullanıma hazır hale geldiğinde translasyona uğrar (Balhorn, 2007).

TP1 6.2-kDa, yüksek ölçüde bazik (%20 kadarı arjinin ve lizin) bir proteindir (Kistler ve ark., 1975, Kleene ve ark., 1988). TP2 ise 13-kDa, bazik (%10 arjinin ve lizin) bir proteindir (Grimes ve ark., 1977, Kleene ve Flynn, 1987). Bu iki proteinin tek benzerlikleri yüksek bazikliği, ekzon-intron genomik paternleri (Schlüter ve ark., 1996), ve gelişimsel ekspresyonlarıdır.

Aracı nükleer proteinler (TP'ler) yalnızca uzayan ve yoğunlaşmakta olan spermatid çekirdeklerinde konumlanır (Meistrich, 1989). Bu proteinler ilk olarak 10-11. step spermatidlerde tespit edilmiştir (Alfonso ve Kistler, 1993; Heidaran ve ark., 1988). En yüksek seviyelerine TP2'den 2,5 kat fazla olan TP1 seviyeleriyle 12-13. steplerde ulaşırlar (Yu ve ark., 2000). Step 15'in erken evresinden sonra tespit edilmezler (Alfonso ve Kistler, 1993; Heidaran ve ark., 1988) (Şekil 13, 14).



Şekil 13: Memeli spermiyogenezinin evrelerinin şematik gösterimi. Morfolojik değişiklikler ve histon tipleri spermiyogenezin farklı evrelerinde açıklanmaktadır. 12-15 stepler arasında bulunan aralık transisyon proteinlerinin histonların yerini aldığını belirtmektedir (Pradeepa ve Rao, 2007).



Şekil 14: Lümenе dökülmeden hemen önce yoğunlaşmış spermatide gelişen yuvarlak spermatidlerde histonların transisyon proteinleri ve protaminlerle değişimini gösteren diyagram (Sharma ve Agarwal, 2011).

TP'lerin bazı olası rolleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

- TP1 nükleozomları destabilize edip DNA'ya bağlanmasını öneleyebilir; bu özelliklerin her ikisi de histonların değişimine katkı sağlar (Baskaran ve Rao, 1990; Levesque ve ark, 1998).
- TP2'nin çinko uçları seçici olarak CpG bölgesine bağlanır ve RNA sentezinin genel ekspresyonu için sorumlu olabilir (Kundu ve Ras, 1996).
- TP'ler hem DNA zincir kırılmalarında gruplaşma faktörü olarak rol oynayabilir, hem de TP1 zincir kırılmalarına onarıcı olarak katılabilir (Boissonneault, 2002; Caron ve ark, 2001)
- TP2 daha etkili olmasına karşın, hem TP1 hem de TP2 DNA'yı yoğunlaştırabilir (Baskaran ve Rao, 1990; Levesque ve ark, 1998; Brewer ve ark, 2002). TP2 sperm çekirdeğinin şekillenmesinde, histon değişiminde, kromatin kondensasyonuna girişte, protaminlerin DNA'ya bağlanmasında veya fertilitede kritik bir faktör değildir, fakat

PRM2'nin normal sürecini gerçekleştirmesinde ve sonuç olarak kromatin kondensasyonunu tamamlamasında zorunludur (Zhao ve ark, 2001).

2.3.1.1.3. Spermatozoonda protaminler tarafından DNA paketlenmesinin önemi

DNA kondensasyonu birkaç maddeyle aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- Daha sıkı ve hidrodinamik bir nükleus oluşturmak için erkek genomunun yoğunlaşmasını sağlar.
- Genetik bilgiyi nükleazlardan, mutajenlerden, ROT (Reaktif oksijen türevleri) hasarından veya diğer faktörlerden korur.
- Spermiyogenez sırasında epigenetik modifikasyonu sağlar.
- Oositteki imprintleme kodunu resetlemeye yardım etmek için transkripsiyon faktörleri ve proteinleri kaldırır.

Sonuç olarak bir çok çalışmada; Prm2'ye sahip olmayan erkeklerle şiddetli kısırlık arasında bir bağlantı olduğu (de Yebra ve ark,1998; Carrell ve Liu, 2001); Prm1/Prm2 oranlarının azalması ya da artmasının; üreme kabiliyetinde düşüşe sebep olduğu (de Yebra ve ark,1993; Carrell ve Liu, 2001; Aoki ve ark, 2006; Oliva, 2006); azalmış Prm1/Prm2 oranının, Prm2 proteininin düşük miktarının çoğu kez sonucu olduğu (Carrell ve Liu, 2001; de Yebra ve ark, 1998; Aoki ve ark, 2005); insan sperm protamin disregülasyonunun, düşük semen kalitesi parametreleri, düşük sperm işlevi, bozulmuş DNA bütünlüğüyle ilişkili olduğu (de Yebra ve ark, 1998; Balhorn ve ark, 1999; Carrell ve Liu, 2001; Aoki ve ark, 2005) ve normal Prm1/Prm2 oranına sahip hastalarla karşılaştırıldığında, düşük ya da yüksek orana sahip olanlarda sperm konsantrasyonunun, hareket yeteneğinin, morfolojisinin önemli derecede düşüş gösterdiği (Aoki ve ark, 2005) bulunmuştur.

2.4. Hücre Ölümü; Nekroz ve Apoptosis

Zedelenme hücre görünümünde değişiklik oluşturmadan çok önce hücre işlevlerinde kayıp meydana gelir. Hücre görünümünde oluşan değişiklikler ancak bir süre sonra fark edilir. Uyarılar hücrenin uyum kapasitesini aştığında geri dönüşsüz zedelenme ortaya çıkar ve hücre ölümüne neden olur. Hücre ölümünün önemli bir göstergesi, hücre içindeki enzim ve proteinlerin anormal şekilde geçirgenleşen hücre zarından kan dolaşımına sızmasıdır. Geri dönüşsüz zedelenme sonucunda kalp kası hücrelerinden kreatin kinaz enziminin;

hepatositlerden transaminaz enzimlerinin ve karaciğerde safra yolları epitelinden de alkalen fosfataz enziminin dolaşıma geçen miktarları artar ve bu organların hastalıkları hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar. Hücre ölümünün iki temel biçimi nekroz ve apoptozdur (Özdamar ve ark, 2011).

Nekroz hücre ölümünün; membran bütünlüğünün bozulması ve hücre içeriğinin dışarı sızması sonucu hücrelerin parçalanması ile ilişkili tipi olup; büyük ölçüde enzimlerin ölümcül derecede hasar görmüş hücre üzerindeki yıkıcı etkileri sonucu gerçekleşir. Dışarıya sızan hücre içeriği çoğu zaman, inflamasyon adı verilen, lokal konak reaksiyonuna yol açar. Bu reaksiyonun amacı, ölü hücreleri ortadan kaldırmak ve sonraki onarım sürecini başlatmaktır. Hücrenin sindirilmesinden sorumlu enzimler, ölmekte olan hücrenin bizzat kendisine ait lizozomlardan ve ölü hücrelere karşı gelişen inflamatuvar reaksiyonun bir parçası olarak bölgede toplanan lökositlerin lizozomlarından kaynaklanabilir. Nekroz, zedelenmiş hücrelerin sitoplazmasındaki ve çekirdeğindeki değişikliklerle karakterizedir

- **Sitoplazma değişiklikleri:** Nekroza uğrayan hücrelerde eozinofili artışı (hematoksilen-eozin [H&E] boyasında E harfiyle temsil edilen eozin boyasıyla pembe renge boyanma özelliğinin artması) görülür. Bu artış kısmen, eozinin denatüre plazma proteinlerine bağlanmasıyla, kısmen de sitoplazmadaki normal olarak ribonükleik asit (RNA) tarafından sağlanan bazofilinin (“ H&E” kısaltmasında H harfiyle temsil edilen, hematoksilen boyasıyla mavi renkte boyanma özelliği) azalması ile açıklanabilir. Nekroza uğrayan hücre canlı hücrelerle karşılaştırıldığında, özellikle glikojen partiküllerinin kaybolmuş olması sonucu daha camsı, homojen bir görünüme sahiptir. Miyelin figürleri nekroza uğrayan hücrelerde, geri dönüşlü hasara uğramış hücrelerde olduğundan daha belirgindir. Organelleri enzimler tarafından sindirilen sitoplazma vakuollü ve "güve yeniği" görünümündedir. Nekrotik hücreler elektron mikroskopisinde; plazma ve organel membranlarındaki kesintilerle, mitokondrilerde büyük, şekilsiz (amorf) dansitelerin ortaya çıkmasıyla ve belirgin genişlemeyle, lizozomların parçalanması ve intrasitoplazmik miyelin figürleriyle karakterizedir.

- **Hücre çekirdeğindeki değişiklikler:** Tümü DNA ve kromatin yıkımı nedeniyle gerçekleşen üç sonuçtan biri şeklindedir: deoksiribonükleaz (DNAz) aktivitesi sonucu kromatin bazofilisi soluklaşabilir (karyoliz); çekirdek, DNA'nın büzülmüş, solid bir kitle hâlini almasıyla büzülebilir ve artmış bir bazofili sergileyebilir (piknoz); ya da piknotik çekirdek, parçalanır (karyoreksis) (Şekil 8). Ölen hücrenin çekirdeği, 1-2 gün içerisinde tamamen ortadan kaybolabilir. Elektron mikroskopunda, çekirdeğin parçalanmasıyla sonuçlanan, ağır çekirdek değişiklikleri görülür.

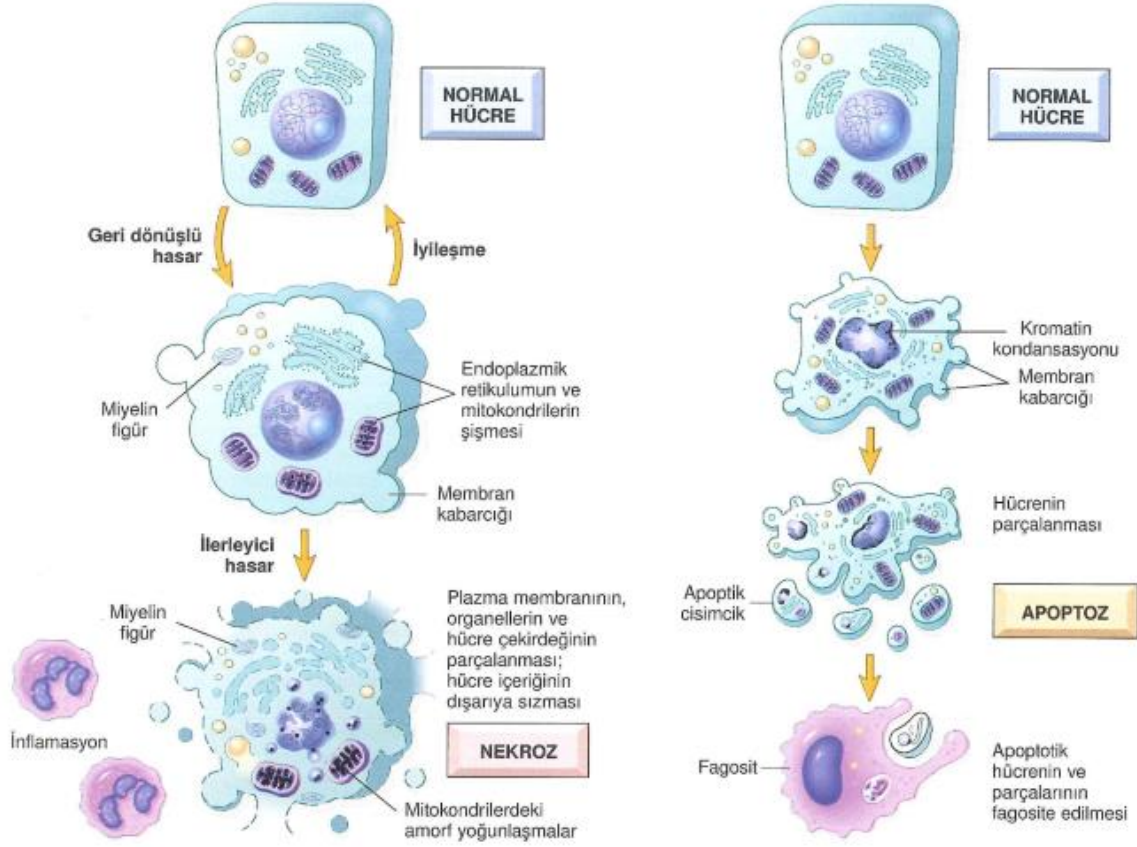
- **Nekrotik hücrelerin akıbeti:** Nekrotik hücreler, bir süre daha yerlerinde kalabilirler ya da enzimler tarafından sindirilerek tamamen kaybolabilirler. Ölü hücreler miyelin figürlerine dönüşürler. Bunlar ya diğer hücreler tarafından fagositte edilirler ya da yağ asitlerine parçalanırlar. Bu yağ asitlerinin kalsiyum tuzlarına bağlanması, ölü hücrelerin sonunda kalsifiye olması ile sonuçlanabilir (Kumar ve ark, 2013).

Apoptozis programlı hücre ölümüdür ve vücutta sıkı denetim altındadır. Bu programın işlevi, konağa mümkün olduğunca zarar vermeden istenmeyen hücrelerin seçici olarak yok edilmesidir. Hücrenin yapısı değişir, hücre zarı sağlam kalır ve fagositoz için belirgin bir hedef haline gelir. Apoptotik hücrenin içeriği çevreye sızmadan hızla ortadan kaldırılır. Bu yüzden konakta iltihabi bir yanıt gelişmez. Apoptozis hücrelerin enzimatik olarak sindirildiği, iltihabi yanıtın geliştiği ve membran bütünlüğünde bozulmanın gerçekleştiği nekrozdan farklıdır (Şekil 15). Apoptozis ve nekroz bazen aynı anda gerçekleşebilir. Apoptozis fizyolojik veya patolojik olabilir.

Fizyolojik apoptozis nedenleri:

- Embriyogenez sırasında programlı hücre yıkımı
- Erişkinlerde endometrium, prostat gibi dokuların hormona bağımlı olarak küçülmesi
- Hücre sayısını sabit tutmak için hücre azaltılması
- İşlevini yerine getiren hücrelerin ölümü
- Potansiyel olarak zararlı lenfositlerin ortadan kaldırılması
- Virüsle infekte veya neoplastik hücrelerin ortadan kaldırılması için sitotoksik T hücrelerince uyarılan hücre ölümü

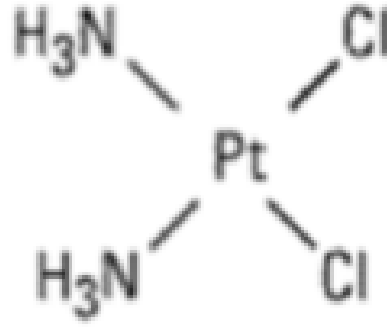
Patolojik apoptozis nedenleri: Çeşitli zedeleyici uyaranlar tarafından meydana getirilir. DNA onarım mekanizmaları zedelenme ile baş edemezse, hücre malign (habis) dönüşüme neden olabilecek genetik değişim riskini engellemek için apoptozis ile intihar eder. Hepatit gibi bazı viral enfeksiyonlarda görülen hücre ölümü, pankreasta pankreas kanalı tıkanıklığı sonrası gelişen patolojik atrofi ve tümörlerde gözlenen hücre ölümü buna örnek verilebilir. Apoptozis hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve parçalanması, hücre baloncuklaşma, apoptotik cisimciklere parçalanma ve apoptotik cisimciklerin çevredeki sağlıklı hücreler veya makrofajlar tarafından fagositte edilmesini kapsar. İltihap izlenmez (Özdamar ve ark, 2011).



Şekil 15: Nekroz (solda) ve apoptozisin hüresel özellikleri (Kumar ve ark, 2013)

2.5.Sisplatin

Platin bileşikler, diğer antineoplastik ilaçlardan farklı olarak organik platin türevli geniş spektrumlu ilaçlardır. Bu gruptaki ilaçlardan tedaviye ilk giren sisplatindir. Sisplatin birçok solid tümörün tedavisinde sıklıkla kullanılan platin bileşiği bir kemoterapotik ajandır. İlk defa 1970 yılında *Escherichia coli*'nin büyüme inhibitörü olarak keşfedilmiştir. Araştırmacılar platin elektrotları üzerinde elektrik potansiyeli oluşturulduğu zaman alanda üreme olmadığını ve bunun üzerine sisplatinin hücre bölünmesini inhibe ettiğini fark etmişlerdir. Daha sonraki yıllarda anti kanser etkisi fark edilerek testis, over, serviks, baş ve boyun, küçük hücreli dışı akciğer ve lenfoma tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Sisplatinin moleküler yapısı incelendiğinde iki klorid iyonu ve iki amin grubunun tetravalent platinyum atomu ile cis konfügurasyonu şeklinde bağlandığı belirtilmiştir (Şekil 16) (Rosenberg B,1985).

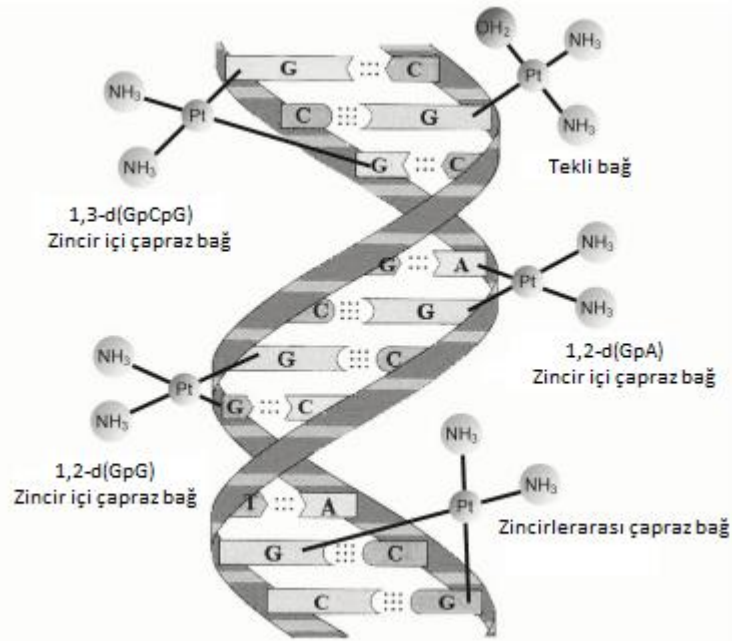


Şekil 16: Sisplatinin moleküler yapısı

Sisplatinin dokulara ve plazma proteinlerine %90 oranında bağlanması ve kısmen geri dönüşümsüz olarak DNA ile etkileşmesinden dolayı sitotoksiktir. Karashawa ve Steyger'e göre (2015) sisplatin toksisitesine katılan anahtar mekanizmalar dokuda oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoza neden olur. Uygulamadan 4 ay sonra bile dokuda platin saptanabilir. Diğer alkilleyici antineoplastik ilaçlarda olduğu gibi, sisplatin de DNA hasarına ve hücre büyümesinin yavaşlamasına neden olur; ve bu hasarı proksimal renal tübüller üzerindeki etkisi ile gösterir. (Chen ve ark,2013; Howland ve Mycek, 2009).

Kuhlmann ve ark.'nın 1997 yılındaki çalışmasında sisplatinin primer ve sekonder etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Sisplatin nükleolar hasar ve ribozomal bozukluğa yol açarak protein sentezi inhibisyonuna neden olarak ayrıca sitoplazma ve mitokondride glutatyon (GSH) ve protein-SH bozulmasına neden olarak primer etkisini gösterir. Sekonder etkisini ise, taşıyıcı proteinlerin inaktivasyonu, lipid peroksidasyonuna; Na^+ , K^+ , -ATPaz inhibisyonu, Ca^{++} alınımında azalma, ATP bozulması, membran potansiyeli kaybına yol açarak mitokondriyal hasar üzerinden gösterir.

Sisplatin DNA ile zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturarak etkileşir (Şekil 17). Bu çapraz bağlar DNA'nın çoğalmasını ve RNA'nın sentezini engellediği için sitotoksik etkiden sorumludur. Sisplatin'in bağlandığı DNA, tekrar replike olamadığı için ortaya çıkan DNA hasarı apoptozu uyarır. Bu hasar onarılamayacak boyutta olduğunda, hücre tarafından tolere edilemez ve hücrenin ölümüne neden olur (Kanter ve ark,2007).



Şekil 17: Sisplatin ile oluşan DNA etkileşim formları. Sisplatin intravenöz yolla verilerek kan dolaşımına geçmekte, ancak klor konsantrasyonunun yüksek ($\approx 100\text{mM}$) olması nedeniyle değişikliğe uğramamaktadır. Hücre içine girdiğinde burada klor konsantrasyonu düştüğü için ($\approx 4\text{mM}$), klor iyonlarını kaybederek 2 adet su molekülü almakta ve $+2$ yük kazanmaktadır. Bu şekilde hücre içi makromoleküller; protein, RNA ve DNA ile bağlanabilir duruma gelmektedir. Sisplatinin bir su molekülünü kaybederek DNA'ya bağlanması ile tekli bağ formları meydana gelmekte ancak bunların %90'ı tekrar reaksiyona girerek çapraz bağları oluşturmaktadırlar (Bozok Çetintaş&Eroğlu, 2013).

Sisplatinin neden olduğu sitotoksiteden en fazla hücre döngüsünün G1 ve S evresinde olan hücreler etkilenir. Sisplatin proteinlere ve tiyol grubu içeren diğer organellere bağlanabilir (Howland ve Mycek, 2009). Sisplatin nefrotoksitesinde oluşan tübüler hücresel hasar uzun yıllar araştırmalara konu olmuştur. Hücresel toksisitede inflamasyon, oksidatif hasar ve apoptoz sorumlu tutulmuştur.

Reaktif oksijen türevleri (ROT) hücreler arası haberleşmede ikincil haberciler olarak rol oynar ve normal hücrelerde birçok biyolojik süreç için gereklidir. Fizyolojik koşullar altında ROT, ROT üreticileri tarafından sürekli üretilir ve ROT temizleme sistemleri tarafından redoks homeostazisini sağlamak için bertaraf edilir. Hücreler; farklılaşma ve proliferasyon gibi hücresel süreçleri desteklemek, metabolik ve immün stres adaptasyonuna izin vermek için ideal olan redoks dengesini sağlamayı hedefler. Endojen ve ekzojen sebepleri olan redoks dengesinin değişimi; hücresel hasar veren oksidatif strese ve hücre haberleşmesinin bozulmasıyla sonuçlanan hem ROT seviyelerinde hem de üretim oranında artışa neden olur. ROT'un azalması ise hücresel haberleşmede sıkıntıya ve bu yüzden hücre homeostazisinin bozulmasına sebep olur. Genellikle kanser hücre metabolizmasındaki

değişiminin sonucu olan redoks dengesizliği, oksidatif stres ve bu stresi dengelemek için anormal antioksidan seviyeleri birçok kanserin karakteristik özelliğidir (Cairns ve ark, 2011; Glasaur ve ark, 2014). ROT'un kanserdeki rolü çift taraflıdır. ROT kanserin başlamasına, devam etmesine, aktivasyon boyunca yayılmasına dahil olurken; aynı zamanda hücresel proliferasyon, canlılık, anjiyogenez ve metastazı düzenleyen sinyal yollarının oluşmasına sebep olabilir. (Weinberg ve ark, 2010; Wallace, 2012; Weinberg ve ark, 2009). ROT tümör oluşumuna yol açan hücre sinyal olaylarına katıldığında, onkojen rolü üstlenir. Diğer taraftan, kanser hücrelerindeki ROT'un fazlalığı hücre ölümü sinyalini, yaşlılığı ve hücre arrestini uyandırabilir (Ichijo ve ark, 1997; Moon ve ark, 2010).

2.5.1. Sisplatinin testislere etkisi

İnsanlarda kanser tedavisi sırasında karşılaşılan başlıca yan etkiler azoospermi ve testiküler atrofidir. Hayvan modellerinde sisplatinin spermatogenezde uzun süreli hasarlara yol açtığı, leydig hücrelerini inhibe ederek testosteron salgısını bozduğu, akut veya kronik kemoteropi maruziyetinin germ hücrelerinde apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (Ahmed ve ark, 2011). Sisplatin uygulaması ile testislerde Bax artarken, BCL2 azalmıştır. Spermatogenez diğer kemoterapotik ilaçlara nazaran sisplatine daha duyarlıdır. Sisplatin, testiküler antioksidan seviyesini azaltarak lipid peroksidasyonu indükler (Ahmed ve ark, 2011; Turk ve ark, 2011). Testislerde histopatolojik olarak, seminifer tübül sayısında azalma, tübüllerde atrofi, dejenerasyon, spermatogonyumlarda vakuolizasyon, germ hücre sayısında azalma ve seminifer tübül epitelinde incelmeye, Johnsen's testis skorlamasında azalma görülür (Turk ve ark, 2011).

Yapılan çalışmalarda, sisplatin uygulanan grup kontrol ile karşılaştırıldığında testis dokusunda lipid peroksidasyonu artmış, antioksidan tedavi olan grupta ise lipid peroksidasyonu azalmıştır. Sisplatin ile indüklenen hayvanların testislerinde O₂ ve malondialdehit (MDA) artarken, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve GSH seviyeleri ve testiküler ağırlık, plazma testosteron seviyeleri azalmıştır (İlbey ve ark, 2009; Narayana ve ark, 2012; Marcon ve ark, 2011; Boekelheide, 2005).

2.6. Kurkumin

Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılan bir baharatın bileşiminde bulunan ve zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinden izole edilen sarı renkli bir bileşiktir. Ayurveda tıbbında zerdeçal; dahili olarak midevi, tonik, kan temizleyici ve harici olarak cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılır (Jayaprakasha ve ark, 2005). Geleneksel Hint Tıbbında ise tozundan safra hastalıklarının tedavisinde, anoreksi, grip, soğuk algınlığı, diyabetik yaralar, hepatik rahatsızlıklar, romatizma ve sinüzitte yararlanıldığı kayıtlıdır (Ammon ve ark, 1992). Bununla birlikte Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi [Food and Administration (FDA)], kurkumini “genellikle güvenli kabul edilir” (generally recognized as safe) listesinde yayımlamıştır ve şu anda birçok ülkede gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır (Goel ve ark, 2008; Gupta ve ark, 2013). Yaklaşık son 50 yılda yapılan detaylı araştırmaları özetleyen bir çalışmada, kurkuminin kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein [low density lipoprotein (LDL)] düzeyini düşürdüğü, platelet agregasyonunu ve miyokard infarktüsünü engellediği, Tip 2 diyabet, romatoid artrit, multipl skleroz ve Alzheimer ile ilişkili semptomları azalttığı, HIV replikasyonunu inhibe ettiği, karaciğer ve akciğer toksisitesini önlediği, safra salgılamasını artırdığı, katarakt oluşumuna karşı koruyucu, ayrıca kanserin önlenmesi ve tedavisinde etkin rolü olduğu belirtilmiştir (Aggarwal ve ark, 2003; Pari ve ark, 2008).

Geleneksel kullanımlarından yola çıkılarak uçucu yağın kimyasal içeriği, kurkuminoitlerin izolasyonu, tanımlanması ve çeşitli biyolojik aktiviteleri hakkında birçok araştırma yapılmıştır. Antienflamatuvar özelliklerinin ortaya çıkmasıyla birlikte 1970’li yıllarda zerdeçal üzerindeki ilgi artmaya başlamıştır. Antiseptik, koku ve tat düzeltici olarak bilinen zerdeçalın klinik testlerle antibakteriyel etkileri kanıtlanmış, böylece gıda ve kozmetik alanının dışında da kullanımı artmıştır (Ammon ve ark, 1992; Govindarajan, 1980; Khanna, 1999; Srimal, 1997). *Curcuma longa*’nın sağlıktaki önemi, içeriğindeki fenolik yapıların antioksidan özelliklerinin anlaşılması ile önemli ölçüde değişmiştir. Lipit peroksidasyonu enflamasyon, kalp hastalıkları ve kanserde önemli rolü bulunan bir faktördür. *Curcuma longa*’nın; süperoksit dizmutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimleri muhafaza ederek lipit peroksidasyonunu düşürebildiği gözlenmiştir. *Curcuma longa*’dan izole edilen maddeler, ortamdaki linoleik asite karşı bir model sistemde ve beyindeki lipitlerin *in vitro* peroksidasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda güçlü antioksidan aktivite göstermiştir (Jitoe ve ark, 1992; Masuda ve ark, 1992; Sharma, 1976; Toda ve ark, 1985). Kurkumin ayrıca lipit peroksidasyonunu tetikleyen süperoksit anyonu, hidroksil radikali gibi serbest oksijen radikallerini ve nitrojen dioksit radikallerini süpürücü etki göstermiştir (Reddy ve ark,

1992; Sreejayan ve ark, 1994; Unnikrishnan ve ark, 1992). Kurkuminin, yara tedavisinde ve artritte antibakteriyal ve antienflamatuvar olarak, safra salgısını kontrol ederek yağların hazmedilmesine yardımcı, kolesterol düşürücü özelliği ile kalp krizlerinde önleyici, karaciğer koruyucu, lenfomatik tümör hücrelerinin büyümesini önleyici ve tümör gelişimini durdurucu özellikleri nedeniyle kullanıldığı bilinmektedir. Son zamanlarda antikanserojen ve antimutajenik özellikleri ile ilgili bilimsel çalışmalar artarak devam etmektedir (Jayaprakasha ve ark, 2006; Kunnumakkara ve ark, 2007; Sandur ve ark, 2007; Sarvalkar ve ark, 2011). Rizomlardan, tüketme işlemleri sonucu kurkuminoitler adı verilen fenilpropan yapısındaki maddeler izole edilmiştir. Kurkuminoitler ve ana madde kurkumin üzerinde yapılan çalışma sayısı son yıllarda giderek artmaktadır. Etkileri üzerinde yapılan çalışmalar aşağıdaki şekilde gruplandırılabilir:

- Antiviral, antibakteriyal, antifungal aktivite
- Antienflamatuvar aktivite
- Antioksidan aktivite
- Antiartrit aktivite
- Alzheimer tedavisi
- Antidiyabetik aktivite
- Antiallerjik aktivite
- Antikanser aktivite (kolon, akciğer, göğüs, prostat, cilt kanseri)

Yapılan literatür incelemelerinin sonucunda kurkumin ve sisplatinin spermatogenetik seri hücreleri üzerine etkilerini inceleyen sınırlı sayıda çalışma mevcutken (İlbey ve ark, 2009; Mercantepe ve ark, 2018); DNA paketlenmesi ve hücre apoptozisi üzerine etkilerini inceleyen çalışmaya rastlanamamıştır. Sunulan çalışmada, sisplatinin spermatogenetik seri hücreleri üzerinde meydana getirdiği değişikliklerin histokimyasal, immünohistokimyasal, TUNEL ve ultrastrüktürel yöntemlerle incelenmesi, ayrıca oral olarak verilen kurkuminin bu hücreler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Protokolü

Deneylelerimiz Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu'nun (BÜHADYEK) 22.02.2016/1 tarih ve kodlu toplantısında alınan onay doğrultusunda Boğaziçi Üniversitesi Yaşam Bilimleri ve Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi Deneysel Hayvan Üretim ve Bakım Biriminde (Vivarium) gerçekleştirildi.

Çalışmamızda Sprague Dawley soyuna ait ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan 8-10 haftalık erkek sıçanlar kullanıldı. Kontrol, sisplatin, kurkumin ve kurkumin+sisplatin olmak üzere dört grup oluşturuldu. Her grup üç alt gruba ayrılarak toplam 12 alt grup elde edildi. Her alt grupta 3 adet olmak üzere toplam 36 sıçan çalışmada kullanıldı (Tablo 1).

Kontrol grubundaki ilk alt gruba yalnızca deneyin ilk günü 14 ml/kg serum fizyolojik intraperitoneal (IP) yolla (Resim 1) verildi. Diğer alt gruba 15 gün boyunca gavaj yoluyla (Resim 2) 2'şer ml/gün mısır yağı verildi. Son alt gruba ise ilk gün 14 ml/kg serum fizyolojik ip yolla verildikten sonra 15 gün boyunca 6 ml/kg/gün mısır yağı gavaj yoluyla verildi. Kontrol grubundaki sıçanlar 16. günde CO₂ gazı ile ötenazi (Resim 3) edilerek testis dokuları alındı (Resim 4).

SİS grubundaki sıçanlara ise yalnızca deneyin ilk günü tek doz 7 mg/kg sisplatin (50 mg etken madde içeren 100 ml'lik hazır solüsyondan 14 ml/kg; KOÇAK Barkod no: 8699828770077) IP yolla verildi (Ateşşahin ve ark, 2006; Türk ve ark, 2008). SİS grubundaki alt gruplar sırasıyla 6, 11, ve 16. günlerde CO₂ gazı ile ötenazi edilerek testis dokuları alındı.

KMN grubundaki sıçanlara deney grubuna göre 5, 10, 15 gün boyunca 200 mg/kg KMN (Curcumin Sigma C1386) 6 ml/kg/gün mısır yağında çözündürülerek gavaj yoluyla verildi (Chuang ve ark, 2000; Bayrak ve ark, 2008) ve sırasıyla 6, 11, ve 16. günlerde CO₂ gazı ile ötenazi edilip testis dokuları alındı.

SİS+KMN grubundaki sıçanlara deneyin ilk günü tek doz 7 mg/kg SİS IP yolla uygulandıktan sonra deney grubuna göre 5, 10, 15 gün boyunca 200 mg/kg kurkumin 6 ml/kg/gün mısır yağında çözündürülerek gavaj yoluyla verildi. Bu gruptaki sıçanlar sırasıyla 6,

11 ve 16. günlerde diğ er gruplarda olduğu gibi CO₂ gazı ile  tenazi edilip testis dokuları alındı (Tablo 1).



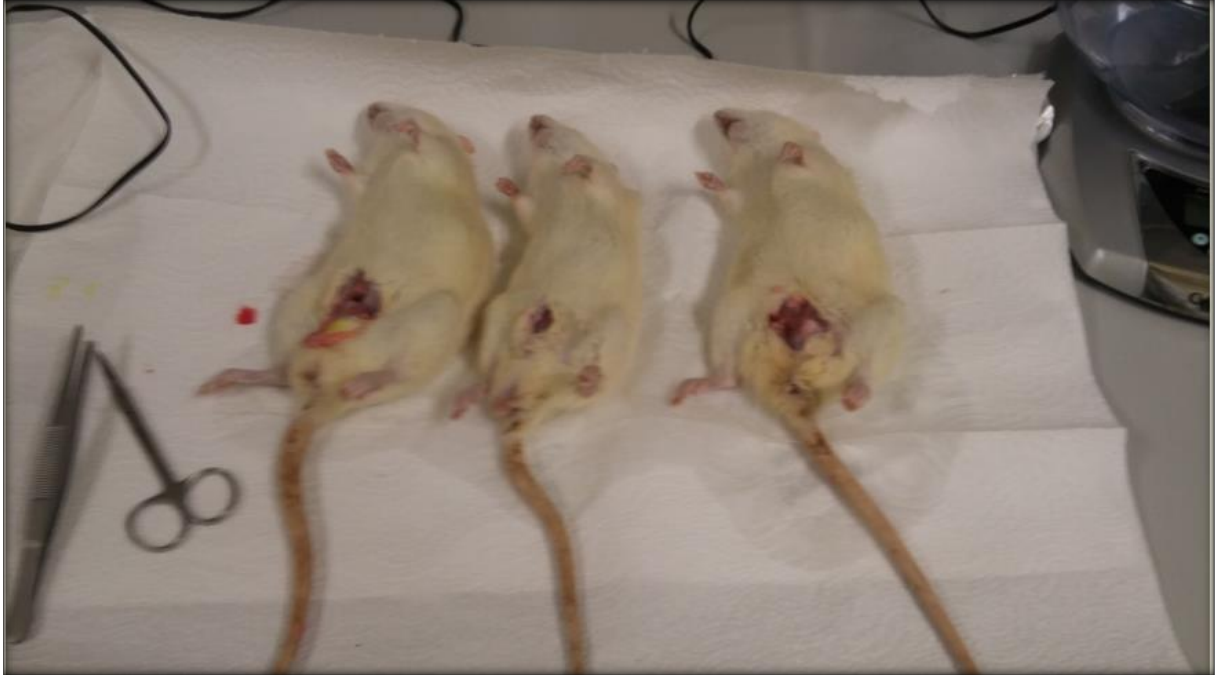
Resim 1: Sıçana intraperitoneal ilaç uygulaması.



Resim 2: Bir sıçana gavaj uygulaması.



Resim 3: CO₂ gazı ile ötenazi uygulaması.



Resim 4: Sakrifiye edilen sıçanlardan testis dokularının alınması.

Tablo 1: Deney Protokolü

| Gruplar | Sıçan Sayısı | Yöntem | Deney Süresi |
|-------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Kontrol-Serum fizyolojik | 3 | Tek doz 14 ml/kg serum fizyolojik deneyin ilk günü ip olarak uygulandı. | 16. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| Kontrol-Mısır Yağı | 3 | Deney süresince 6 ml/kg/gün mısır yağı gavaj yoluyla yedirildi. | Deney 15 gün uygulandı. 16. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| Kontrol-Serum fizyolojik+mısır yağı | 3 | Deneyin ilk günü 14 ml/kg serum fizyolojik ip yolla uygulandıktan sonra deney süresince 6 ml/kg/gün mısır yağı gavaj yoluyla yedirildi. | Deney 15 gün uygulandı. 16. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| | 3 | | 6. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| Sisplatin (SİS) grubu | 3 | Tek doz 7 mg/kg SİS (hazır solüsyondan 14 ml/kg) ip yolla uygulandı. | 11. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| | 3 | | 16. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| | 3 | | Deney 5 gün boyunca uygulandı. 6. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| Kurkumin (KMN) grubu | 3 | 200 mg/kg KMN 6 ml/kg/gün mısır yağı içerisinde çözülüp, gavaj yoluyla deney boyunca yedirildi. | Deney 10 gün boyunca uygulandı. 11. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| | 3 | | Deney 15 gün boyunca uygulandı. 16. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| | 3 | | Gavaj 5 gün boyunca uygulandı. 6. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| SİS+KMN grubu | 3 | Tek doz 7 mg/kg SİS ip yolla uygulanadıktan sonra 200 mg/kg KMN gavaj yoluyla deney boyunca yedirildi. | Gavaj 10 gün boyunca uygulandı. 11. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |
| | 3 | | Gavaj 15 gün boyunca uygulandı. 16. günde hayvanlar sakrifiye edildi. |

3.3. Işık Mikroskopik İnceleme

3.3.1. Histometrik değişimler

Gruplar için seminifer tubulus çaplarını ölçmek için her hayvandan rasgele seçilen 10 adet yuvarlak veya yuvarlağa yakın tubuluslardan 2 adet ölçüm yapılarak ortalaması alındı. (Songur A ve ark, 2016). Ölçümler görüntü Olympus BX43F araştırma mikroskobu ve CellSens Entry Görüntü Analiz Programı yardımıyla interaktif olarak gerçekleştirildi.

3.3.2. Histokimyasal İnceleme

Sıçanlardan alınan sol testis dokusu ışık mikroskobu takibi için Bouin solüsyonunda 24 saat tespit edildi ve doku takip cihazı kullanılarak rutin doku takip aşamalarından sonra parafine gömüldü. Alınan 5µm kalınlığında kesitler bir gece 37°C etüvde bekletilip hematoksilen-eosin (H&E) boyaması yapılarak histolojik olarak değerlendirildi.

Spermatogenez histopatolojik olarak Johnsen ortalama testiküler biyopsi puanı (MTBS) kriterleri kullanılarak değerlendirildi (Johnsen, 1970; Aktaş C ve ark, 2012) Her hayvana ait 3 preparata bu kriterlere göre 0-10 puan verildi.

Tablo 2: Johnsen kriterleri

| Johnsen skoru | Özellik |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 puan | Tübüllerde germ hücresi veya Sertoli hücresi bulunmaz. |
| 2 puan | Tübüllerde germ hücresi bulunmaz. |
| 3 puan | Tübüllerde yalnızca spermatogonia bulunur. |
| 4 puan | Tübüllerde birkaç spermatosit bulunur. |
| 5 puan | Tübüllerde spermatosit bulunur; fakat spermatozoa veya spermatid bulunmaz. |
| 6 puan | Tübüllerde birkaç uzayan spermatid bulunur. Spermatid farklılaşmasında sorun vardır. |
| 7 puan | Tübüllerde birçok uzayan spermatid bulunur; uzamış spermatid bulunmaz. |
| 8 puan | Tübüllerde sadece birkaç spermatozoa bulunur. |
| 9 puan | Tübüllerde birçok spermatozoa bulunur; fakat tübüler epitel düzenli değildir. |
| 10 puan | Tübüllerde spermatogenezin tüm aşamaları görülür. |

3.3.2. İmmünohistokimyasal İnceleme

Spermatogenez sürecinde DNA paketlenmesi sırasında histon-protamin proteinleri arasında aracı protein olan transition protein-1 (TP1) proteinini immünohistokimyasal olarak işaretlemek için rabbit TNP1/TP1 poliklonal primer antikoru (LifeSpan Biosciences LS-B11624) antikoru kullanıldı. Bu amaçla her sıçana ait sağ testis immunohistokimyasal inceleme için %10'luk nötral tamponlu formaldehit çözeltisinde tespit edilerek doku takip cihazı kullanılarak rutin doku takip aşamalarından sonra parafine gömüldü. Her hayvana ait bloktan Poly-l-lysin kaplı lamlara 5 µm kalınlığında ikişer adet kesit alındı. Gece boyu 37°C etüvde bekletilen kesitlerin deparafinizasyon ve dehidratasyonu (3 kez 5'er dakika Ksilol, 2 kez 3'er dakika absolü alkol, 3 dakika %96 alkol, 3 dakika %80 alkol, 3 dakika %70 etanol, distile su) yapıldıktan sonra kesitler kaynayan antigen retriavalda (0,1 M tri-sodyum sitrat dihidrat) 5 dakika kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Fosfat tamponu (PBS) ile 2 dakika yıkanan kesitler %3'lük H₂O₂ içerisinde 5 dk bekletildi. PBS ile 3 kez 5'er dk yıkama işleminden sonra kesitler bloklayıcı serumu (Invitrogen, Blocking Solution Lot No: 1666262A) ile 20 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Negatif kontrol olan kesit hariç kesitlere 1/250 oranında sulandırılmış primer antikor (LifeSpan Biosciences, LS-B11624) damlatılarak slaytlar nemli kutuda +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanan slaytlara sekonder antikor (Invitrogen, Broad Spectrum Second Antibody Lot No: 1666262A) damlatılarak nemli kutu içerisinde 37°C etüvde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra slaytlar tekrar 3 kez 5'er dk. PBS'le yıkandı ve her kesite HRP (Invitrogen, HRP-Streptavidin Lot No: 1666262A) damlatılarak 37°C etüvde 1 saat inkübe edildi. Slaytlar PBS'le yıkandıktan sonra renklendirme işlemi için DAB damlatılarak 1 dakika bekletilerek boyama işlemi yapıldı. Hematoksilen ile çekirdek boyamasından sonra kesitler PBS ile yıkandı. Hazır olan preparatlar yükselen alkol serilerinde (%96, %100, %100) 3'er dk bekletildi. 3 kez 5'er dk ksilolde bekletilerek entellan ile kapatılan kesitler incelemeye hazır hale getirildi.

DNA paketlenmesinde histonlar ve protaminler arasında aracı protein olan Transition Protein-1 (TNP-1) antikoru ile işaretlenen spermatidleri değerlendirmek için, seminifer tübüllerde bu proteinin eksprese edildiği XII, XIII, ve XIV. evrelerdeki uzamış spermatidler immunpozitif ve immunnegatif olarak sayıldı. Bunun için her hayvana ait preparatta 3'er adet olmak üzere her grupta her evre için 9 tubuldeki spermatidler sayıldı. Sayılan spermatidlerin yüzde değerleri alınarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

3.3.3. TUNEL Yöntemi

Hücrelerdeki apoptoz tayini için çalışmamızda TUNEL kiti (Merck Milliopore, katalog no: S7100) kullanıldı. Her hayvana ait %10'luk nötral tamponlu formaldehitte tespit edilen dokuların bloklarından Poly-l-ysin kaplı lamlara 5 µm kalınlığında ikişer adet kesit alındı. Gece boyu 37°C etüvde bekletilen kesitlerin deparafinizasyon ve dehidratasyonu (3 kez 5'er dakika Ksilol, 2 kez 3'er dakika absolü alkol, 3 dakika %96 alkol, 3 dakika %80 alkol, 3 dakika %70 etanol, distile su) yapıldıktan sonra kesitler 5 dk. PBS'te bekletildi. Nemli kutuda oda ısısında Proteinaz K uygulamasından sonra kesitler distile suda yıkanarak 20 dk. H₂O₂ içerisinde bekletildi. 2 kez 5'er dk. PBS'te yıkanan slaytlar 5 dk. dengeleme solüsyonunda bekletildi ve sonrasında TdT enzim uygulandı. Durdurma/yıkama solüsyonunda hızlıca çalkalanan preparatlar anti-dioksigenin peroksidaz (APK) konjugatında nemli kutu içerisinde 30 dk. inkübe edildi. Slaytlar 4 kez 2'şer dk. PBS'te yıkandıktan sonra renklendirme işlemi için DAB damlatılıp mikroskop altında takip edilerek boyama işlemi yapıldı. Hematoksilin ile çekirdek boyamasından sonra kesitler çeşme suyu ile yıkandı. Hazır olan preparatlar yükselen alkol serilerinde (%96, %100, %100) 3'er dk bekletildi. 3 kez 5'er dk ksilolde bekletilerek entellan ile kapatılan kesitler incelemeye hazır hale getirildi.

Gruplar için Tubul Başına Düşen Apoptotik Hücre Sayısı ve % TUNEL Pozitif Tubul Oranı belirlendi. Preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus CX21) x40'lık objektif altında incelendi. Kahverengi presipitasyonun görülmesi, reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi. Her hayvan için 100 adet tubulde görülen apoptotik hücreler sayılarak, apoptotik hücre sayısı hesaplandı. Ayrıca her hayvan için sayılan 100 adet tubulde en az bir adet apoptotik hücre içeren tübül sayısı belirlenerek % TUNEL pozitif oranı hesaplandı.

3.4. Elektron Mikroskopik İnceleme

Çalışmamızın elektron mikroskopik doku takibi ve incelemesi İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Kontrol grubu ve 15 günlük deney gruplarından birer sıçandan alınan sol testis dokularının yarısı elektron mikroskobu incelemesi için kakodilat tamponlu %2.5'luk glutaraldehit solüsyonunda 1 gün bekletildi. Elektron mikroskopik doku takibi Leica marka EM TP model doku takip cihazında gerçekleştirildi. Leica marka EM UC7 model ultramikrotom cihazında 70 nm'lik

kesitler grid adı verilen bakır ya da nikel yüzeyli taşıyıcılar üzerine alındı. Uranil asetat ile gerçekleştirilen kontrastlama işleminden sonra kesitler elektron mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı.

3.5. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (for Windows Release 22.0 Standart Version Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılım uygunluğu Shapiro Wilk Testi ile yapıldı. Normal dağılım gösteren vücut ağırlığı ve testis ağırlığı verileri, %TUNEL pozitif tubulus oranı ve seminifer tubulus çapları One-Way ANOVA Testi ve *post-hoc* Duncan Testi ile değerlendirildi.

Histokimyasal ve immunohistokimyasal veriler ve tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı normal dağılım göstermediği için Kruskall Wallis Testi uygulandı ve girişimin önemli olduğu verilerde gruplar arası farkın önem kontrolleri Bonferroni Düzeltmeli Man-Whitney-U Testi ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlığı ile sağ ve sol testis ortalama ağırlık analizi

Her grupta yer alan 3'er adet deney hayvanı deney öncesi ve deney sonrasında tartıldı. Deney öncesi ve deney sonrası ağırlık ortalamaları Tablo 3 ve 4'de özetlendi. Deney öncesi grupların ağırlık ortalamaları istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi (Tablo 3). Deney sonrası grupların vücut ağırlık ortalamaları incelendiğinde sisplatin ve sisplatin+kurkumin gruplarında kontrollere göre vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (Tablo 4).

Her grupta yer alan 3'er adet deney hayvanının sağ ve sol testisleri tartıldı ve ağırlık ortalamaları tablo 5'te özetlendi. Uygulamanın 5. gününde SİS-5, KMN-5, SİS KMN-5 gruplarının testis ağırlıklarının kontrollere göre arttığı görüldü. SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 gruplarının testis ağırlıklarının ise kontrollere göre azaldığı gözlemlendi.

Tablo 3: Deney başlangıcında vücut ağırlığı ortalamaları.

| Grup | Deney öncesi vücut ağırlığı ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) |
|---------------|--------------------------------------------------------------|
| SİS-5 | 294,00±19,00 |
| KMN-5 | 270,66±1,76 |
| SİS KMN-5 | 248,66±1,33 |
| SİS-10 | 284,66±12,34 |
| KMN-10 | 220,66±24,00 |
| SİS KMN-10 | 232,66±2,40 |
| SİS-15 | 228,66±7,68 |
| KMN-15 | 254,00±24,97 |
| SİS KMN-15 | 243,33±11,62 |
| Kontrol Mg | 264,00±7,57 |
| Kontrol Sf | 265,33±7,68 |
| Kontrol Sf Mg | 270,66±20,17 |

SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS KMN-10: Sisplatin ve kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, SİS KMN-15: Sisplatin ve kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol Mg: Mısır yağı verilen kontrol grubu, Kontrol Sf: Serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Kontrol Sf Mg: Serum fizyolojik ve mısır yağı verilen kontrol grubu.

Tablo 4: Deney sonunda vücut ağırlığı ortalamaları.

| Grup | Deney sonrası vücut ağırlığı ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) |
|---------------|---------------------------------------------------------------|
| SİS-5 | 234,66±19,47 ^{c,d,e} |
| KMN-5 | 252,66±5,81 ^{d,e,f} |
| SİS KMN-5 | 210,66±2,9 ^{b,c,d} |
| SİS-10 | 226,93±7,13 ^{b,c,d,e} |
| KMN-10 | 230,69±20,75 ^{b,c,d,e} |
| SİS KMN-10 | 158,21±4,10 ^a |
| SİS-15 | 203,33±3,33 ^{b,c} |
| KMN-15 | 270,66±22,34 ^{e,f} |
| SİS KMN-15 | 187±20,59 ^{a,b} |
| Kontrol Mg | 282±7,21 ^f |
| Kontrol Sf | 294±6,11 ^f |
| Kontrol Sf Mg | 290±20,98 ^f |

a,b,c,d,e,f :Farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS KMN-10: Sisplatin ve kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, SİS KMN-15: Sisplatin ve kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol Mg: Mısır yağı verilen kontrol grubu, Kontrol Sf: Serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Kontrol Sf Mg: Serum fizyolojik ve mısır yağı verilen kontrol grubu.

Tablo 5: Sağ ve sol testis ağırlığı ortalamaları.

| Grup | Sağ ve sol testis ortalama ağırlığı ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) |
|---------------|----------------------------------------------------------------------|
| SİS-5 | 2,56±0,15 ^d |
| KMN-5 | 2,97±0,04 ^e |
| SİS KMN-5 | 2,43±0,13 ^d |
| SİS-10 | 1,82±0 ^c |
| KMN-10 | 1,55±0,1 ^{b,c} |
| SİS KMN-10 | 0,92±0,23 ^a |
| SİS-15 | 1,38±0,07 ^b |
| KMN-15 | 1,59±0,04 ^{b,c} |
| SİS KMN-15 | 0,89±0,25 ^a |
| Kontrol Mg | 1,58±0,02 ^{b,c} |
| Kontrol Sf | 1,72±0,09 ^{b,c} |
| Kontrol Sf Mg | 1,59±0,08 ^{b,c} |

a,b,c,d :Farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS KMN-10: Sisplatin ve kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, SİS KMN-15: Sisplatin ve kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol Mg: Mısır yağı verilen kontrol grubu, Kontrol Sf: Serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Kontrol Sf Mg: Serum fizyolojik ve mısır yağı verilen kontrol grubu.

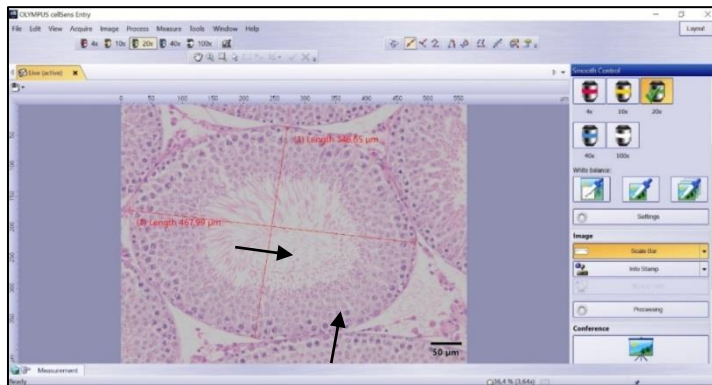
4.2. Seminifer Tubulus Çapı

Seminifer tubulus çaplarını ölçmek için her hayvandan rastgele seçilen 10 adet yuvarlak veya yuvarlağa yakın tubuluslardan 2 adet ölçüm yapıp ortalaması alındı (Resim 5). Bu ölçüm sonuçlarına göre SİS-10, SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 gruplarında tubulus çaplarının diğer gruplara göre daraldığı ve bu daralmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (Tablo 6).

Tablo 6: Seminifer Tubulus Çapı

| Grup | Seminifer Tubulus Çapı $(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$ |
|---------------|-------------------------------------------------------|
| SİS-5 | 306,73±6,69 ^d |
| KMN-5 | 313,11±7,85 ^{e,d} |
| SİS KMN-5 | 299,21±4,88 ^d |
| SİS-10 | 277,12±4,08 ^c |
| KMN-10 | 304,20±5,49 ^d |
| SİS KMN-10 | 251,88±12,75 ^b |
| SİS-15 | 330,93±5,81 ^{e,f} |
| KMN-15 | 304,68±4,6 ^d |
| SİS KMN-15 | 210,93±6,83 ^a |
| Kontrol Mg | 340,53±6,6 ^f |
| Kontrol Sf | 310,87±10,93 ^{e,d} |
| Kontrol Sf Mg | 329,63±8,25 ^{e,f} |

a,b,c,d,e,f : Farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır. (p<0,05). SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS KMN-10: Sisplatin ve kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, SİS KMN-15: Sisplatin ve kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol Mg: Mısır yağı verilen kontrol grubu, Kontrol Sf: Serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Kontrol Sf Mg: Serum fizyolojik ve mısır yağı verilen kontrol grubu.



Resim 5: Seminifer tubulus çap ölçümü. Ölçülen her tubulusta 2 adet ölçüm yapıp (oklar) ortalaması alınmaktadır.

4.2. Histokimyasal bulgular

Hematoksilen Eosin ile boyanan preparatlar evrelerine ayrılmadan ışık mikroskobu altında incelendi. Johnsen kriterlerine göre puanlanan grupların karşılaştırılması tablo 7’de özetlendi ($p<0,05$). Bu tablonun sonuçlarına göre SİS KMN-5, SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 grupları tüm kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak farklı bulundu ($p<0,05$).

Kontrol ve deney gruplarına ait kesitler evreleme yapılarak spermatogenetik seri hücrelerinin yapıları incelendi. Kontrol grubuna ait testis kesitlerinde, seminifer tübüllerin bazal kompartmanında spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri, adluminal kompartmanda ise primer ve sekonder spermatositler ile yuvarlak (erken), uzayan (orta), uzamış (geç) spermatidler ve spermatozoonlar yerleşim göstermekteydi (Resim 6, 7).

Johnsen kriterlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulunan deney gruplarına ait testis kesitleri incelendiğinde özellikle SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 deney gruplarındaki histopatolojik bulgular dikkat çekti. Her iki deney grubunda da spermatogenezde arrest görüldü.

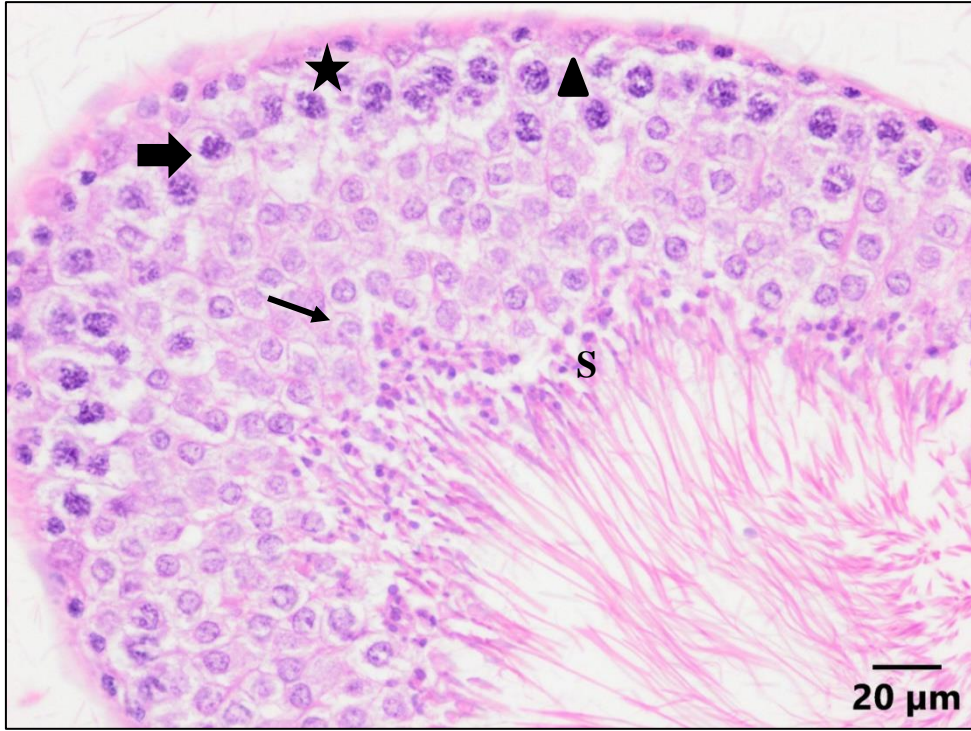
Yapılan mikroskopik incelemelerde, SİS KMN-10 deney grubunda hücre kayıplarına bağlı hücreler arası ayrılmalar, lümende hücre döküntüleri görüldü (Resim 8). Aynı deney grubuna ait seminifer tübüller detaylı incelendiğinde spermatogenez arrestine bağlı olarak spermatogenetik seriye ait hücrelerde devamlılık olmadığı ve spermatogenezin yuvarlak spermatide kadar ilerleyebildiği dikkati çekti (Resim 9, 10).

SİS KMN-15 deney grubuna ait testis kesitleri incelendiğinde Johnsen kriterleriyle paralel olarak daha dramatik bulgular göze çarptı. Bu gruba ait mikroskopik incelemelerde germ hücre kaybı diğer gruplarla karşılaştırıldığında oldukça dikkat çekiciydi. Spermatogenezin spermatositlere kadar ilerleyebildiği ve devamlılık göstermediği görüldü (Resim 11, 12). Diğer yandan hücrelerde morfolojik bozukluklarla birlikte apoptotik hücreler (Resim 12,13,14) ve çok çekirdekli polimorfik dev hücreler (Resim 13) dikkati çekti. Spermatositlerde kromatinde yoğun (dens) görünüm (Resim 13,14), çekirdeklerde büzüşme, tübüler sınırları belirleyen tunika albuginea tabakasının düzensiz hal alması, tübüler büzüşmeye bağlı testis atrofisi (Resim 15) izlendi.

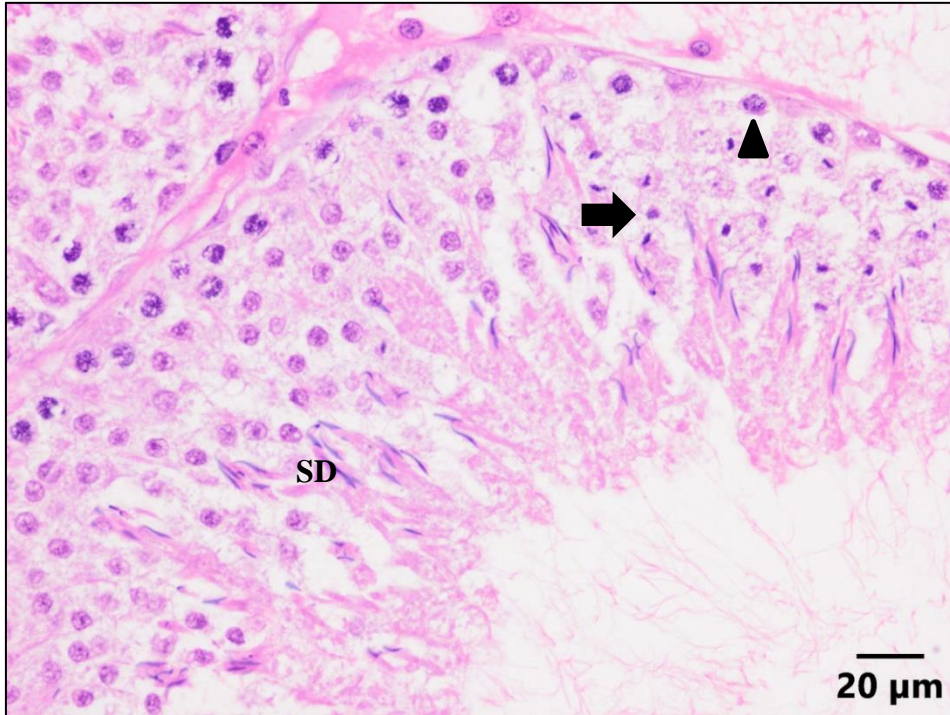
Tablo 7: Johnsen kriter puanlarının gruplar arası karşılaştırılması.

| Grup | Johnsen Skoru $(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$ |
|---------------|----------------------------------------------|
| SİS-5 | 8,55±0,17 ^{d,e} |
| KMN-5 | 9,11±0,2 ^{f,g} |
| SİS KMN-5 | 8±0 ^c |
| SİS-10 | 8,22±0,14 ^{c,d} |
| KMN-10 | 8,88±0,11 ^{e,f} |
| SİS KMN-10 | 7,33±0,16 ^b |
| SİS-15 | 7,88±0,11 ^c |
| KMN-15 | 8±0 ^c |
| SİS KMN-15 | 5,11±0,48 ^a |
| Kontrol Mg | 9,66±0,16 ^h |
| Kontrol Sf | 9,44±0,17 ^{g,h} |
| Kontrol Mg Sf | 9,77±0,14 ^h |

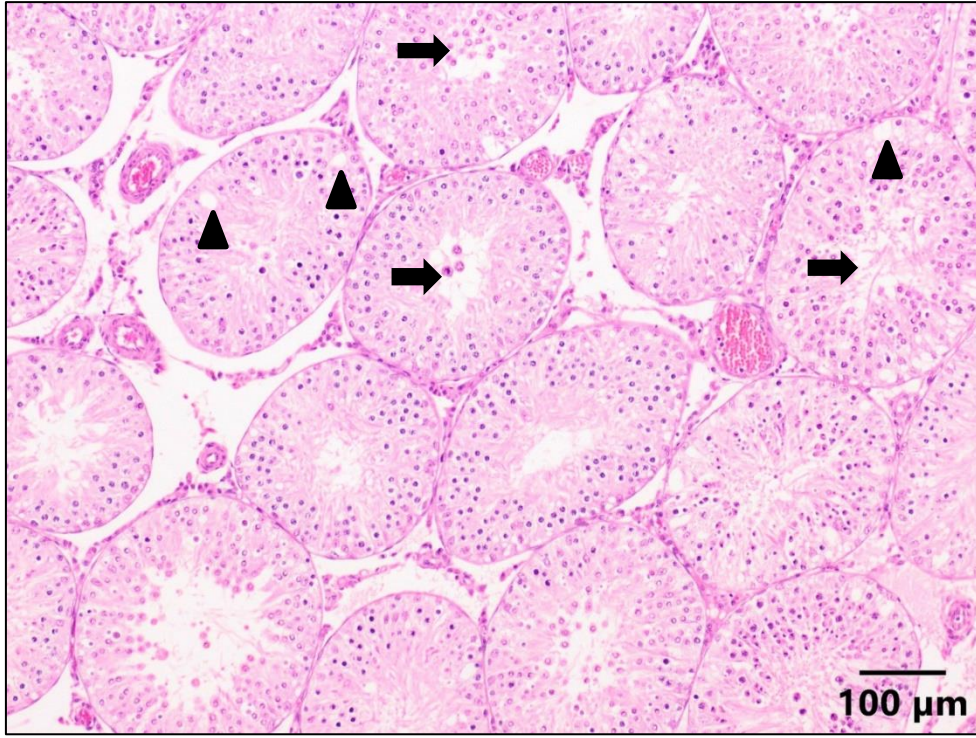
a,b,c,d,e,f,g,h :Farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS KMN-10: Sisplatin ve kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, SİS KMN-15: Sisplatin ve kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol Mg: Mısır yağı verilen kontrol grubu, Kontrol Sf: Serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Kontrol Sf Mg: Serum fizyolojik ve mısır yağı verilen kontrol grubu.



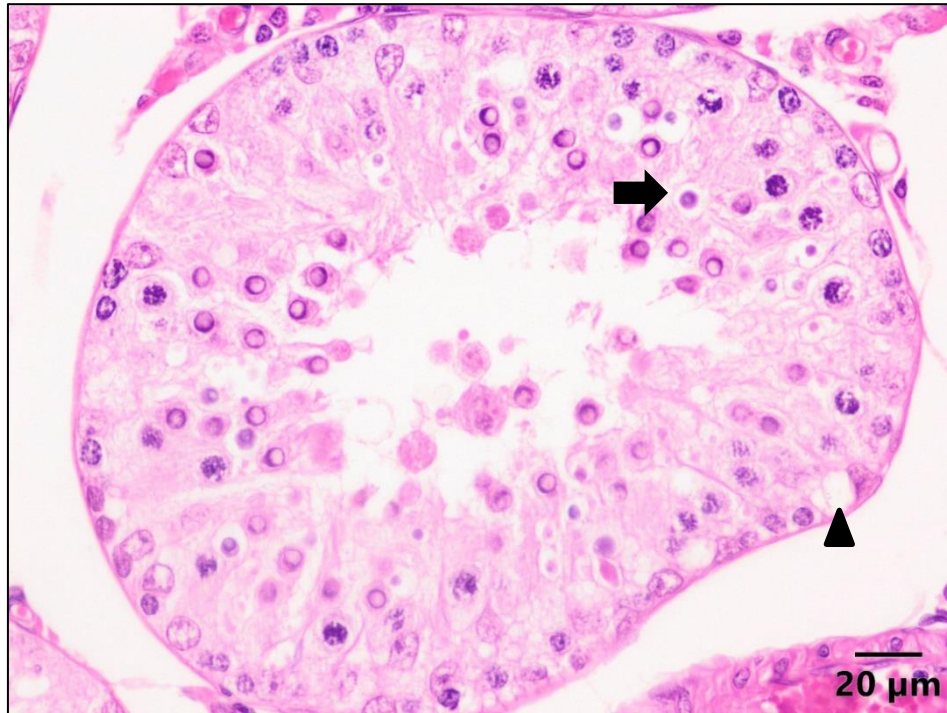
Resim 6: Kontrol sf mg grubundan bir hayvana ait VII. evre seminifer tübül kesiti. Bazal kompartmanda spermatogonyumlar (yıldız) ve Sertoli hücreleri (ok başı), adluminal kompartmanda ise primer spermatositler (kalın ok) ile yuvarlak spermatidler (ince ok) ve spermatozoonlar (S) yer almaktadır. Hematoksilen Eosin boyama yöntemi, Bar: 20 µm.



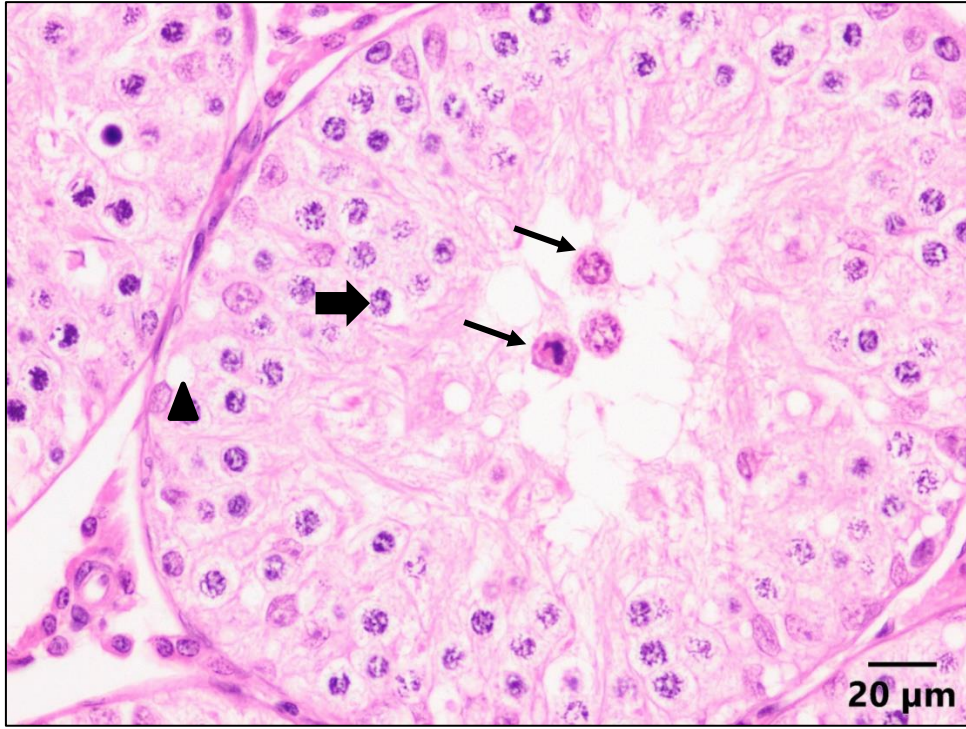
Resim 7: Kontrol sf mg grubundan bir hayvana ait XIV. evre seminifer tübül kesiti. Bazal kompartmanda spermatogonyumlar (ok başı), adluminal kompartmanda ise mayotik spermatositler (kalın ok) ve uzamış spermatidler (SD) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama yöntemi, Bar: 20 µm.



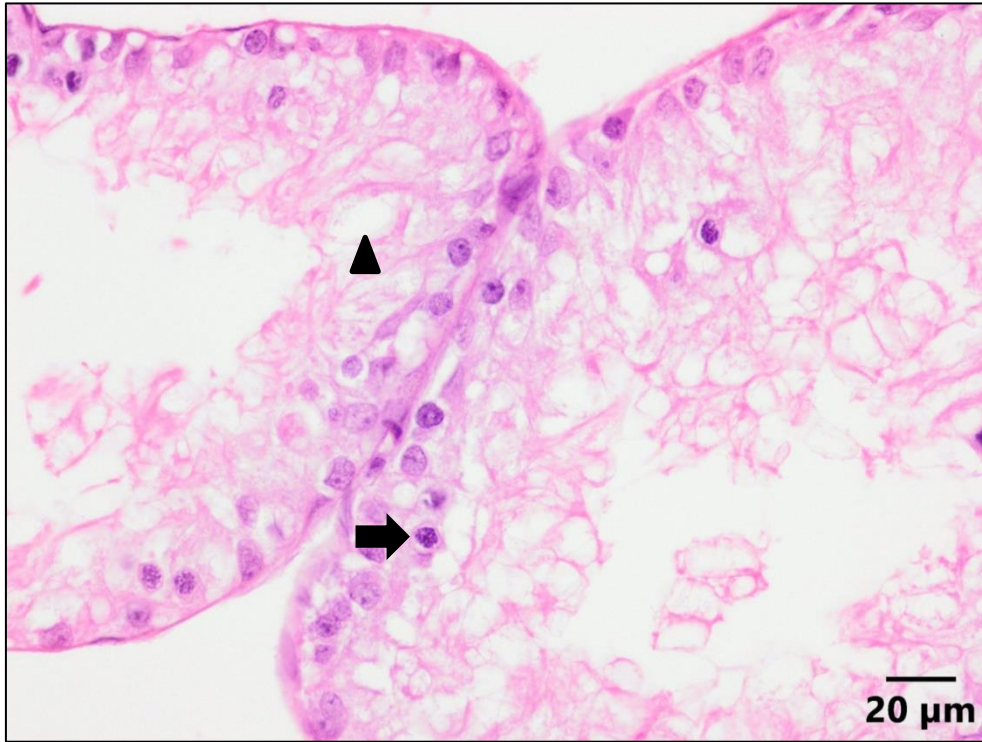
Resim 8: Sis-Kmn 10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. Tubulus lümeninde hücre döküntüleri (ok) ve hücreler arası ayrılmalar (ok başı) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama yöntemi, Bar: 100 µm.



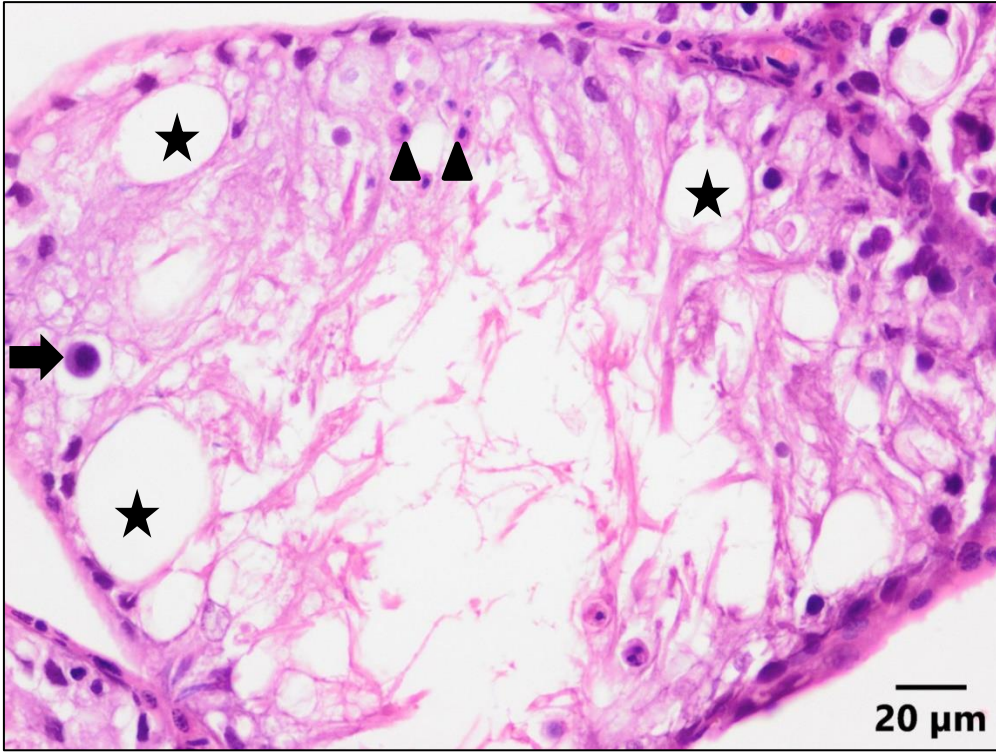
Resim 9: Sis-Kmn 10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. Spermatogenezde yuvarlak spermatitte arrest (ok) ve hücreler arası ayrılmalar (ok başı) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama yöntemi, Bar: 20 µm.



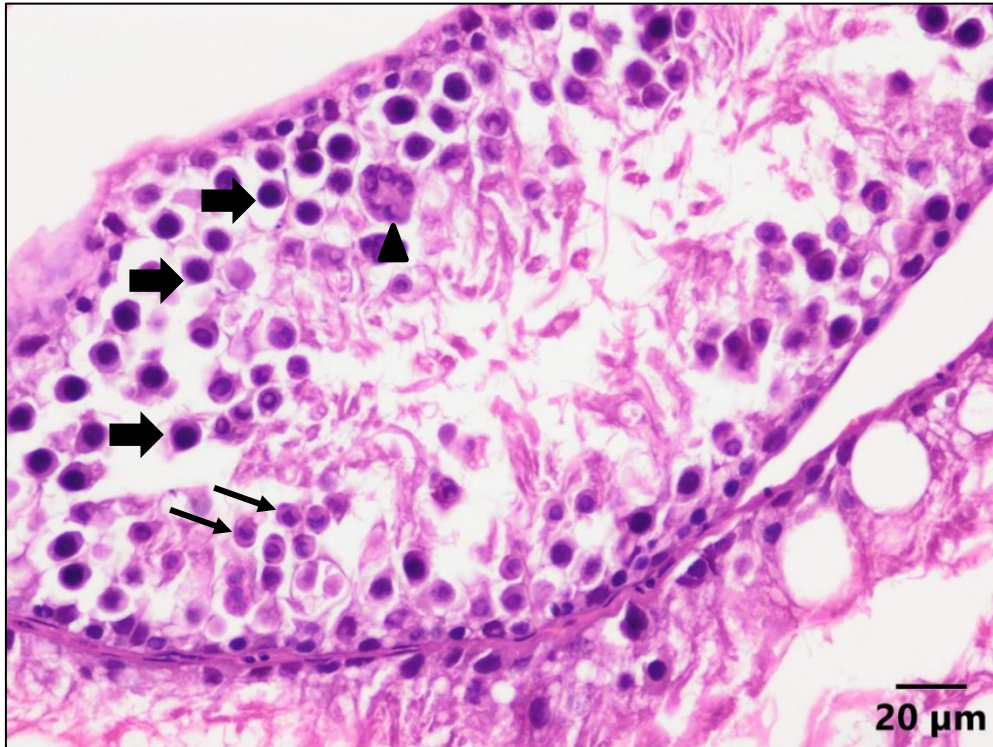
Resim 10: Sis-Kmn 10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. Spermatogenezde primer spermatositte arrest (ok), hücreler arası ayrılımlar (ok başı) ve lümende hücre döküntüleri (ince ok) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama yöntemi, Bar: 20 μ m.



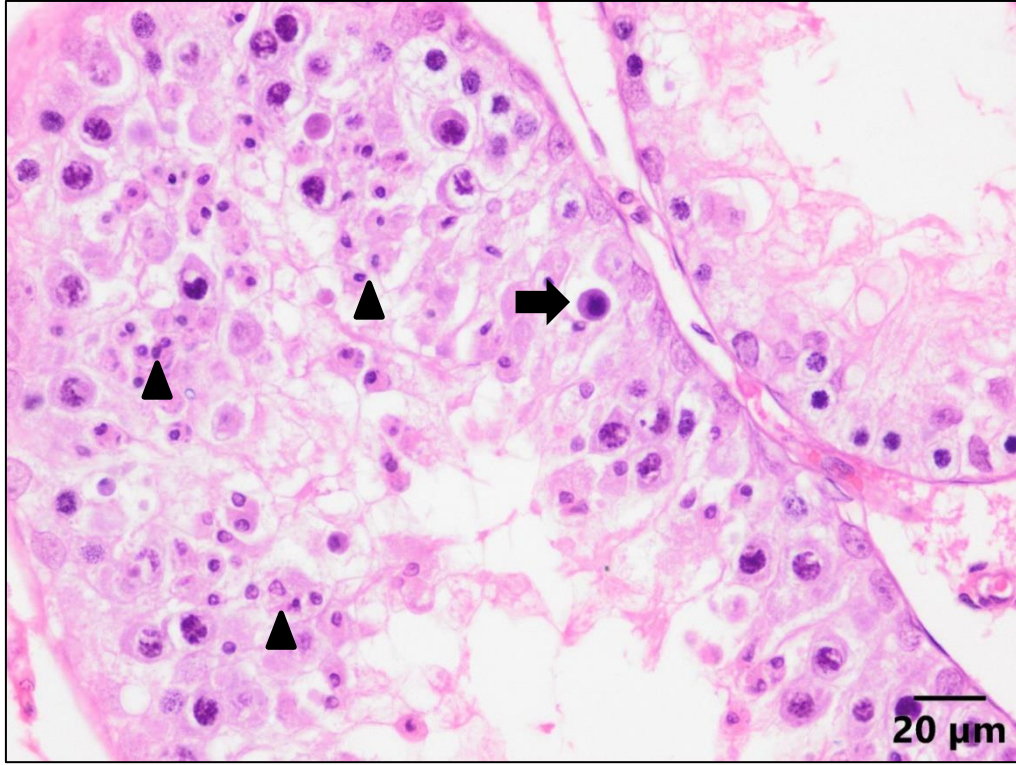
Resim 11: Sis-kmn 15 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. Spermatogenezde primer spermatositte arrest (ok), hücreler arası ayrılımlar (ok başı) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama yöntemi, Bar: 20 μ m.



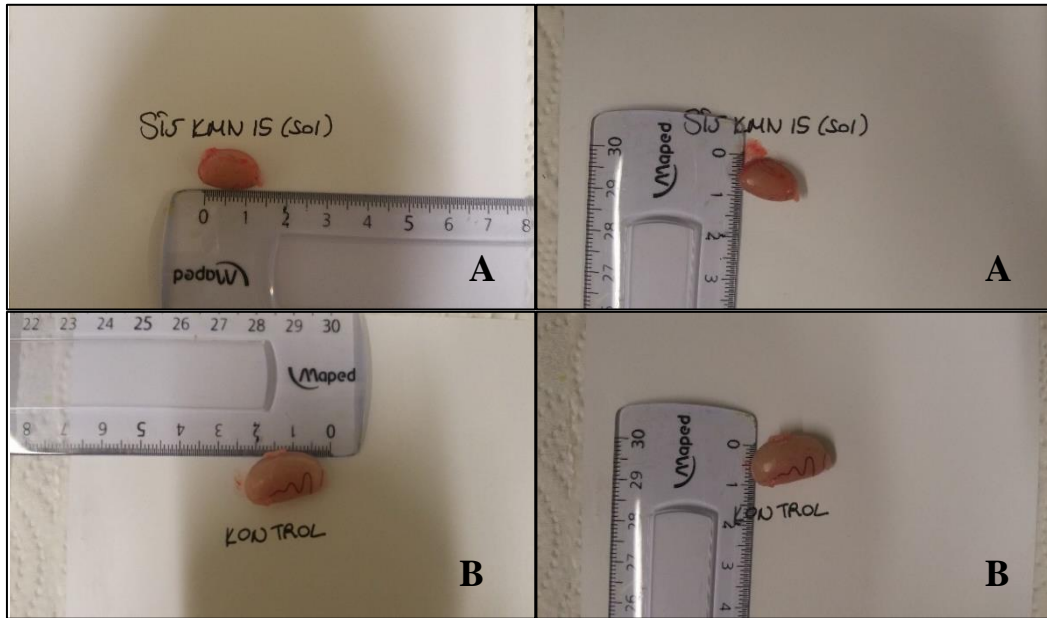
Resim 12: Sis-kmn 15 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. Spermatogenezde primer spermatositte arrest (ok), hücreler arası ayrılmalar (yıldız) ve apoptotik hücreler (ok başı) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama yöntemi, Bar: 20 μm .



Resim 13: Sis kmn-15 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. Çok çekirdekli polimorfik dev hücre (ok başı), kromatinde yoğun görünüm (ok), apoptotik hücreler (ince ok) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama yöntemi, Bar: 20 μm .



Resim 14: Sis kmn-15 deney grubundan bir hayvana ait testis kesiti. Kromatinde yoğun görünüm (ok), apoptotik hücreler (ok başı) görülmektedir. Hematoksilen Eosin boyama yöntemi, Bar: 20 µm.



Resim 15: Atrofik testis. Kontrol grubu (B) ile karşılaştırıldığında SİS KMN-15 grubundan (A) bir hayvana ait testisin atrofik olduğu görülmektedir.

4.3. İmmunohistokimyasal bulgular

Çalışmada, tüm gruplardan elde edilen testis kesitleri TNP-1 (DNA paketlenmesinde histonlar ve protaminler arasında aracı proteinler olan Transition Protein-1) antikoru ile immunohistokimyasal olarak boyandı. Ardından kesitler ışık mikroskopunda incelendi. Testiste TNP-1 ekspresyonu XII, XIII ve XIV. evrelerde olan seminifer tübüllerde uzamış spermatidlerin çekirdeklerinde izlendi.

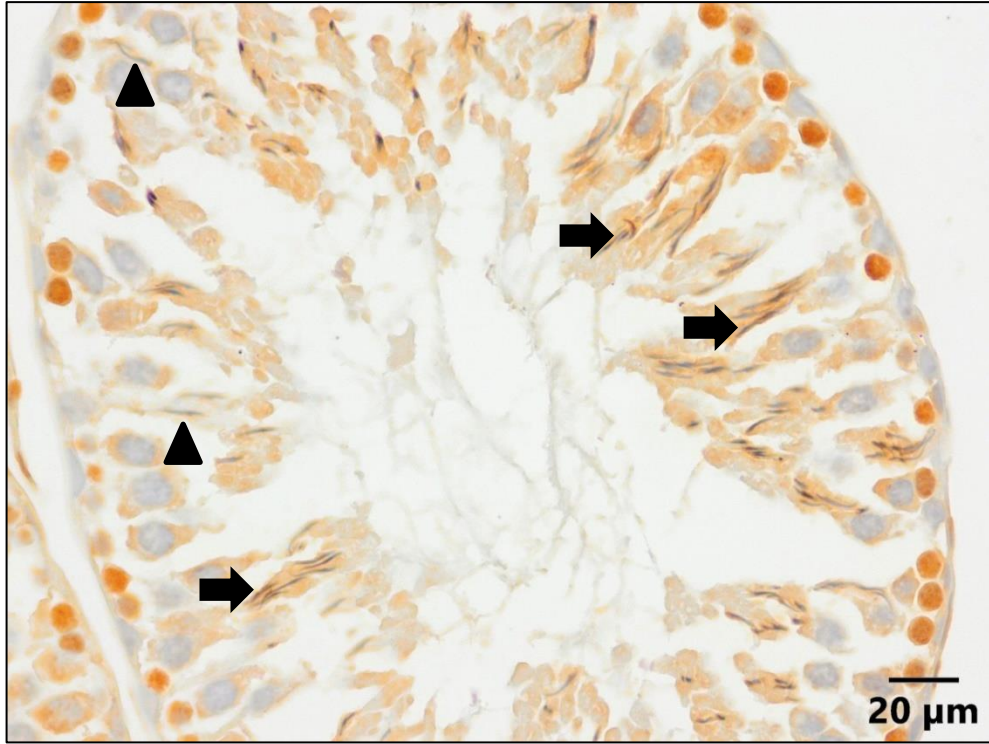
Gruplara göre XII, XIII ve XIV. evre spermatidleri içeren tubulus kesitlerinde TNP-1 pozitif ve negatif uzamış spermatid oranları sırayla tablo 8, tablo 9 ve tablo 10'da verildi. SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 deney gruplarında tübüllerde dejenerasyon görüldüğünden dolayı tubuller evrelerine ayrılamadı ve bu değerlendirmeye alınmadı. Kontrol grupları kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı çıkmadığı için birleştirildi.

Gruplar incelendiğinde, XII. evre immün pozitif uzamış spermatid oranlarının kontrol (Resim 17) ve diğer gruplara göre SİS-5 deney grubunda (Resim 16) belirgin bir şekilde arttığı görüldü ($p<0,05$) (Tablo 8). Genel olarak diğer deneme gruplarında XII. evre immünpozitif uzamış spermatid oranlarının kontrollere göre istatistiksel olarak farklı olmadığı görüldü. Fakat sisplatin verilen gruplarda, 5. günde pozitif spermatidlerin belirgin bir şekilde artmasının ardından 10. günde şiddetli bir şekilde azaldığı ve 15. günde kontrollerin değerine yakın bir şekilde artış gösterdiği dikkati çekti.

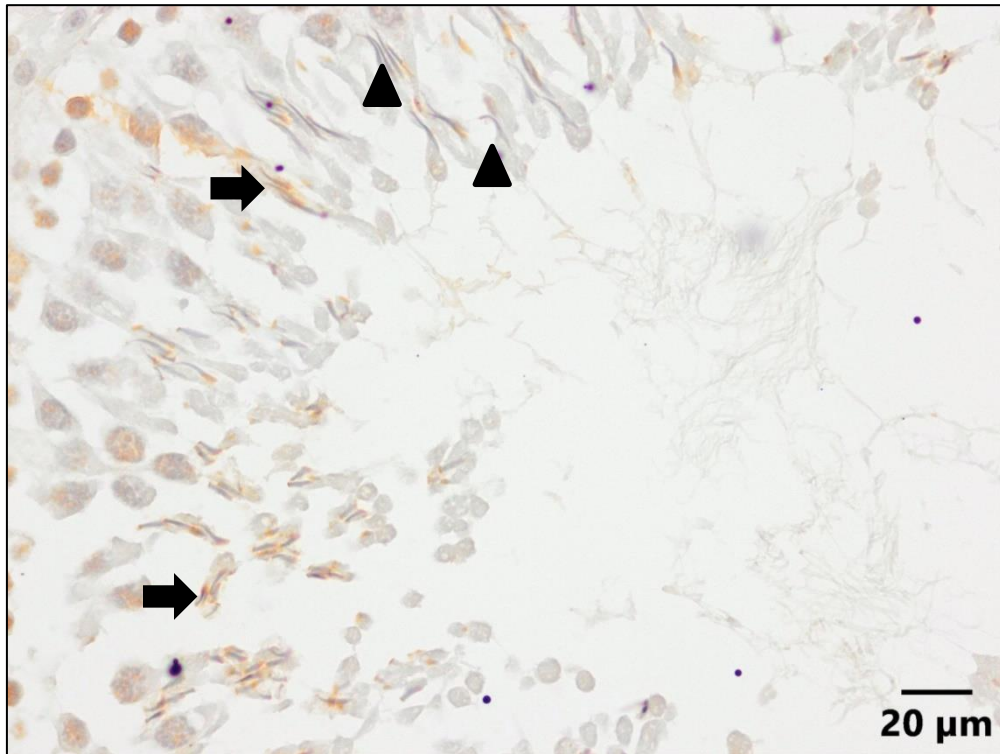
Tablo 8: XII. Evre pozitif ve negatif uzamış spermatid oranlarının gruplar arası karşılaştırılması.

| Grup | $(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$ | |
|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | Pozitif | Negatif |
| SİS-5 | 80,71±4,18 ^a | 19,29±4,18 ^a |
| KMN-5 | 40,94±6,11 ^{a,b,d} | 59,05±6,11 ^{a,b,d} |
| SİS KMN-5 | 29,02±3,61 ^{b,d} | 70,97±3,61 ^{b,d} |
| SİS-10 | 13,45±3,16 ^b | 86,54±3,16 ^b |
| KMN-10 | 48,16±5,89 ^{a,d,e} | 51,84±5,89 ^{a,d,e} |
| SİS-15 | 46,64±5,89 ^{a,d,f} | 53,35±5,89 ^{a,d,f} |
| KMN-15 | 54,05±8,3 ^{a,d,g} | 45,94±8,3 ^{a,d,g} |
| Kontrol Grupları | 37,37±3,47 ^{b,c,d,e,f,g} | 62,62±3,47 ^{b,c,d,e,f,g} |

a,b,c,d,e,f,g : Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol grupları: Tüm kontrol grupları.



Resim 16: SİS-5 deney grubundan bir hayvana ait XII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu. Pozitif (ok) ve negatif uzamış spermatidler (ok başı) görülmektedir. Streptavidin Biotin Yöntemi, Bar: 20 µm.



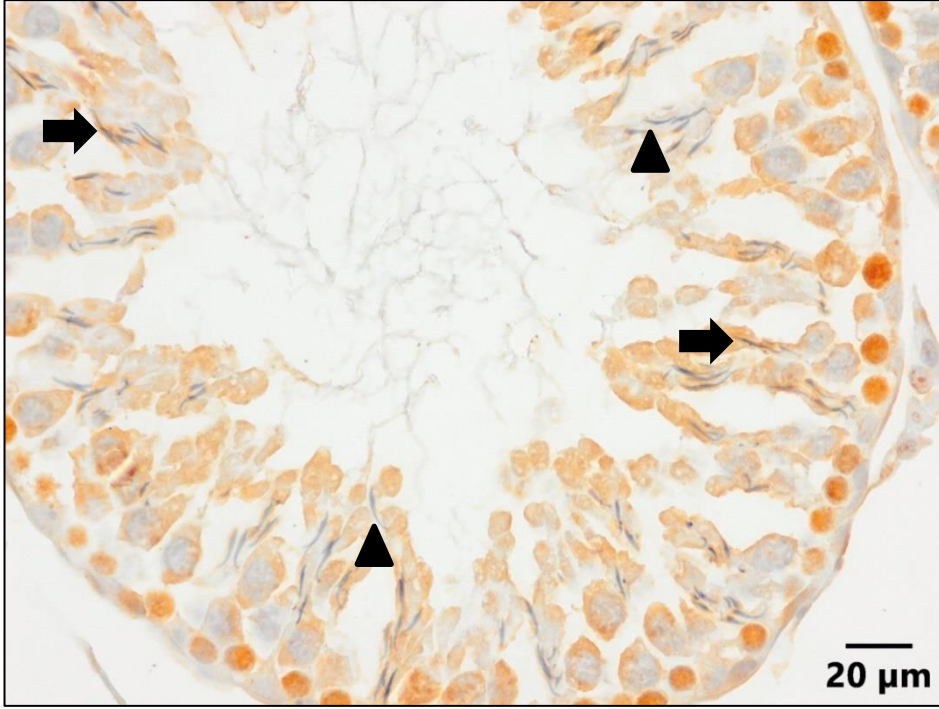
Resim 17: Kontrol grubundan bir hayvana ait XII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu. Pozitif (ok) ve negatif uzamış spermatidler (ok başı) görülmektedir. Streptavidin Biotin Yöntemi. Bar: 20 µm.

XIII. evre immun pozitif uzamış spermatid oranlarının SİS-5 deney grubunda (Resim 18) kontrol gruplarına (Resim 20) göre belirgin bir şekilde arttığı görüldü (Tablo 9). Yine sisplatin verilen gruplarda, 5. günde pozitif spermatidlerin belirgin bir şekilde artmasının ardından 10. ve 15. günde azalarak kontrollerin değerine yaklaştığı dikkati çekti. Fakat ilginç bir şekilde, sadece kurkumin verilen grupta immun pozitif hücrelerin 5. (Resim 19) ve 10. günde arttığı 15. günde ise kontrollere (Resim 20) yakın değerlere indiği gözlemlendi (Tablo 9).

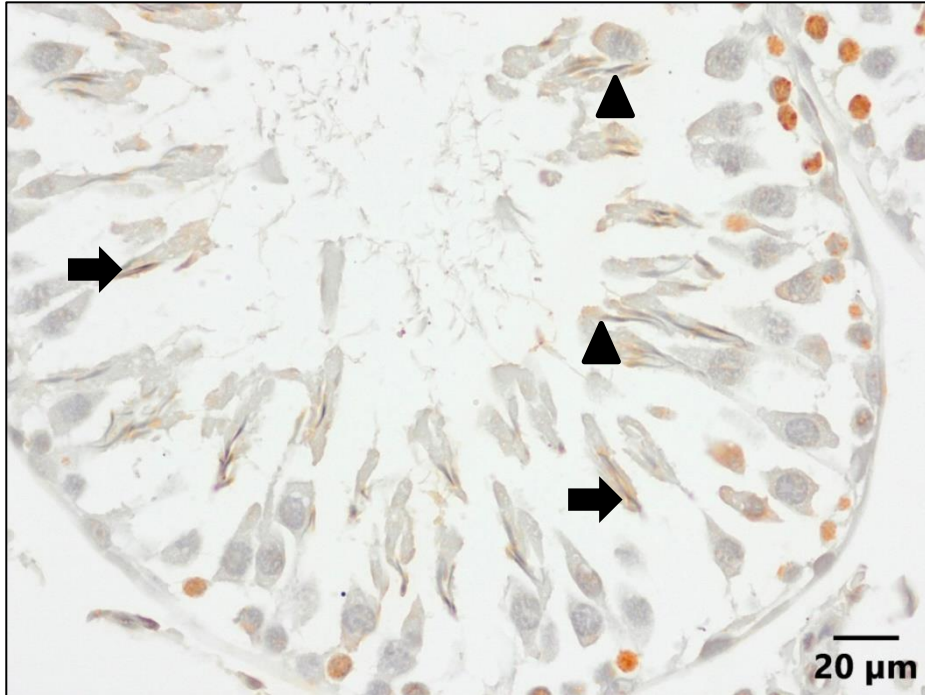
Tablo 9: XIII. evre pozitif ve negatif uzamış spermatid oranlarının gruplar arası karşılaştırılması.

| Grup | $(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$ | |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Pozitif | Negatif |
| SİS-5 | 84,22±2,84 ^a | 15,77±2,84 ^a |
| KMN-5 | 58,26±7,16 ^{a,b,e,g} | 42,11±7,37 ^{a,b,e,g} |
| SİS KMN-5 | 36,75±6,31 ^{a,c,e,f} | 63,24±6,31 ^{a,c,e,f} |
| SİS-10 | 13,06±3,77 ^c | 86,93±3,77 ^c |
| KMN-10 | 56,28±5,38 ^{a,d,g} | 43,71±5,38 ^{a,d,g} |
| SİS-15 | 27,39±1,84 ^{c,g} | 72,60±1,84 ^{c,g} |
| KMN-15 | 20,88±2,50 ^{c,d,e} | 79,14±2,30 ^{c,d,e} |
| Kontrol Grupları | 23,67±3,16 ^{c,f} | 76,27±3,16 ^{c,f} |

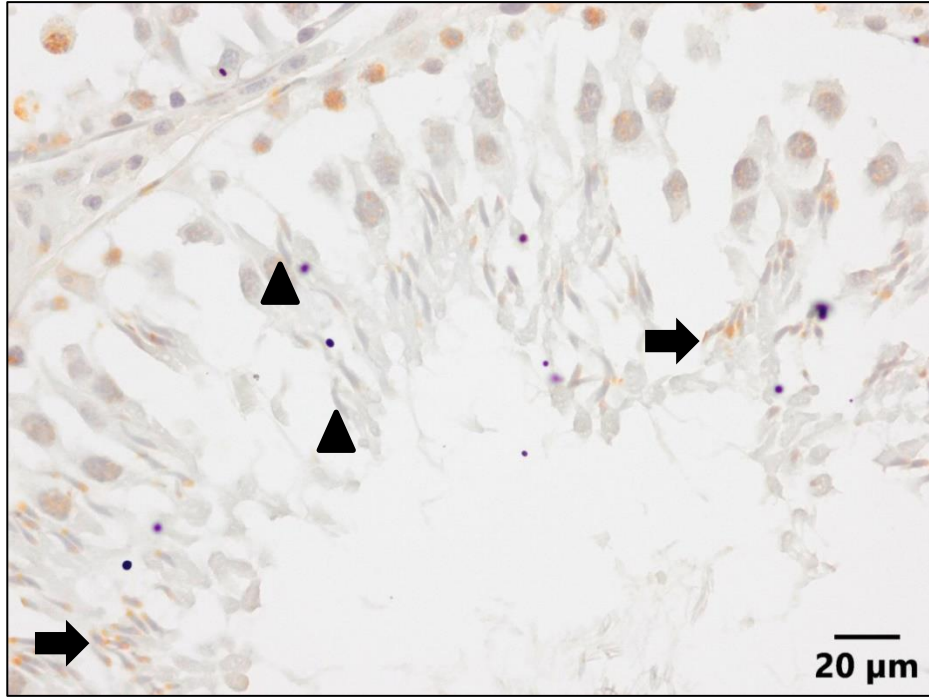
^{a,b,c,d,e,f,g} : Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol grupları: Tüm kontrol grupları.



Resim 18: SİS-5 deney grubundan bir hayvana ait XIII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu. Pozitif (ok) ve negatif uzamış spermatidler (ok başı) görülmektedir. Streptavidin Biotin Yöntemi. Bar: 20 μ m.



Resim 19: KMN-5 deney grubundan bir hayvana ait XIII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu. Pozitif (ok) ve negatif uzamış spermatidler (ok başı) görülmektedir. Streptavidin Biotin Yöntemi. Bar: 20 μ m.



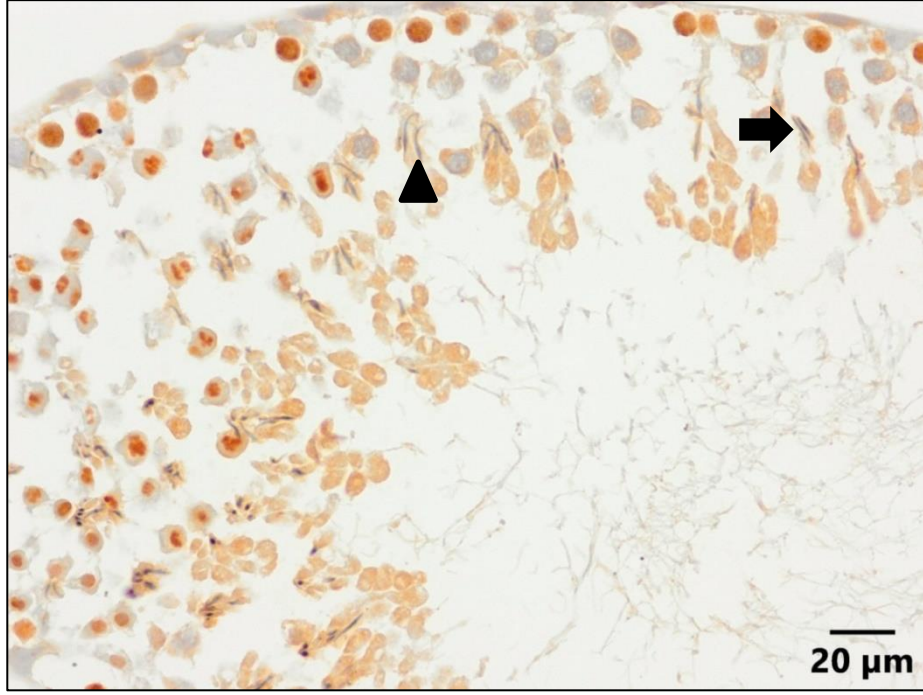
Resim 20: Kontrol grubundan bir hayvana ait XIII. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu. Pozitif (ok) ve negatif uzamış spermatidler (ok başı) görülmektedir. Streptavidin Biotin Yöntemi. Bar: 20 µm.

XIV. evre immun pozitif uzamış spermatid oranlarının SİS-5 deney grubunda (Resim 21) kontrol gruplarına (Resim 22) göre arttığı gözlemlendi. Yine sisplatin verilen gruplarda, 5. günde pozitif spermatid oranlarının belirgin bir şekilde artmasının ardından 10. günde azaldığı 15. günde ise bir artış eğilimi göstererek kontrollerin değerine yaklaştığı dikkati çekti. Bu 10. ve 15. gündeki dalgalanmaya rağmen istatistiksel olarak farklı bulunmadı (Tablo 10.)

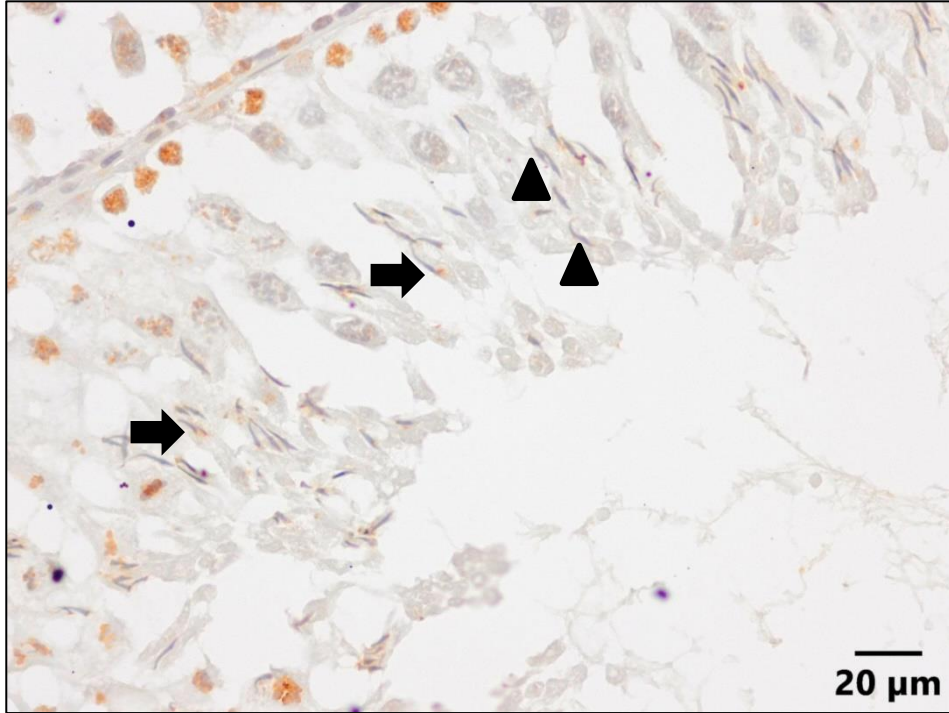
Tablo 10: XIV. evre pozitif ve negatif spermatid oranlarının gruplar arası karşılaştırılması.

| Grup | $(\bar{x} \pm S_{\bar{x}})$ | |
|------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | Pozitif | Negatif |
| SİS-5 | 80,92±2,4 ^a | 18,12±2,74 ^a |
| KMN-5 | 41,55±10,92 ^{a,d} | 58,64±10,34 ^{a,d} |
| SİS KMN-5 | 21,12±2,86 ^{a,b,c,d} | 78,87±2,86 ^{a,b,c,d} |
| SİS-10 | 1,4±1,4 ^b | 98,6±1,4 ^b |
| KMN-10 | 38,15±5,25 ^a | 64,62±4,68 ^a |
| SİS-15 | 19,29±1,25 ^{a,b} | 80,70±1,25 ^{a,b} |
| KMN-15 | 4,72±2,15 ^{b,c} | 95,27±2,15 ^{b,c} |
| Kontrol Grupları | 10,47±2,01 ^{b,d} | 89,02±2,01 ^{b,d} |

^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol grupları: Tüm kontrol grupları.



Resim 21: SİS-5 deney grubundan bir hayvana ait XIV. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu. Pozitif (ok) ve negatif uzamış spermatidler (ok başı) görülmektedir. Streptavidin Biotin Yöntemi. Bar: 20 µm.



Resim 22: Kontrol grubundan bir hayvana ait XIV. evre seminifer tübül kesitinde Tnp-1 ekspresyonu. Pozitif (ok) ve negatif uzamış spermatidler (ok başı) görülmektedir. Streptavidin Biotin Yöntemi. Bar: 20 µm.

4.4. Apoptotik hücre sayısı ve TUNEL pozitif tubul oranı

TUNEL metodu ile yapılan incelemede kontrol gruplarında her tubulusta pozitif hücreye rastlanmadı. Deney gruplarında ise pozitif hücreleri içeren tubullerdeki artış dikkati çekti. Gruplar için tubul başına düşen apoptotik hücre sayısı ve %TUNEL pozitif tubul oranı belirlendi. SİS KMN-15 deney grubunda tubullerde dejenerasyon görüldüğü için bu grup bu değerlendirmeye alınmadı. Gruplara göre tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı tablo 11’de verildi. Veriler incelendiğinde; apoptotik hücre sayılarının, kontrol gruplarına (Resim 28,29,30) ve sadece kurkumin verilen gruplara göre sisplatin ve sisplatin+kurkumin verilen gruplarda arttığı görüldü. Bu artışın SİS KMN-10 (Resim 23,24), SİS-10 (Resim 25) ve SİS-15 (Resim 26, 27) gruplarında oldukça belirgin olduğu dikkati çekti.

Tablo 11: Kontrol ve deney gruplarında seminifer tubul başına düşen apoptotik hücre sayısı.

| Grup | Tübülüs Başına Düşen Apoptotik Hücre Sayısı ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| SİS-5 | 2,73±0,29 ^{a,j} |
| KMN-5 | 0,8±0,1 ^{b,k} |
| SİS KMN-5 | 1,33±0,16 ^{c,k} |
| SİS-10 | 4,42±0,42 ⁱ |
| KMN-10 | 1,31±0,18 ^{a,k} |
| SİS KMN-10 | 20,41±0,78 ^d |
| SİS-15 | 5,2±0,38 ^e |
| KMN-15 | 0,6±0,1 ^{f,k} |
| Kontrol Mg | 0,4±0,07 ^{g,k} |
| Kontrol Sf | 0,4±0,05 ^{h,k} |
| Kontrol Sf Mg | 0,6±0,1 ^{i,k} |

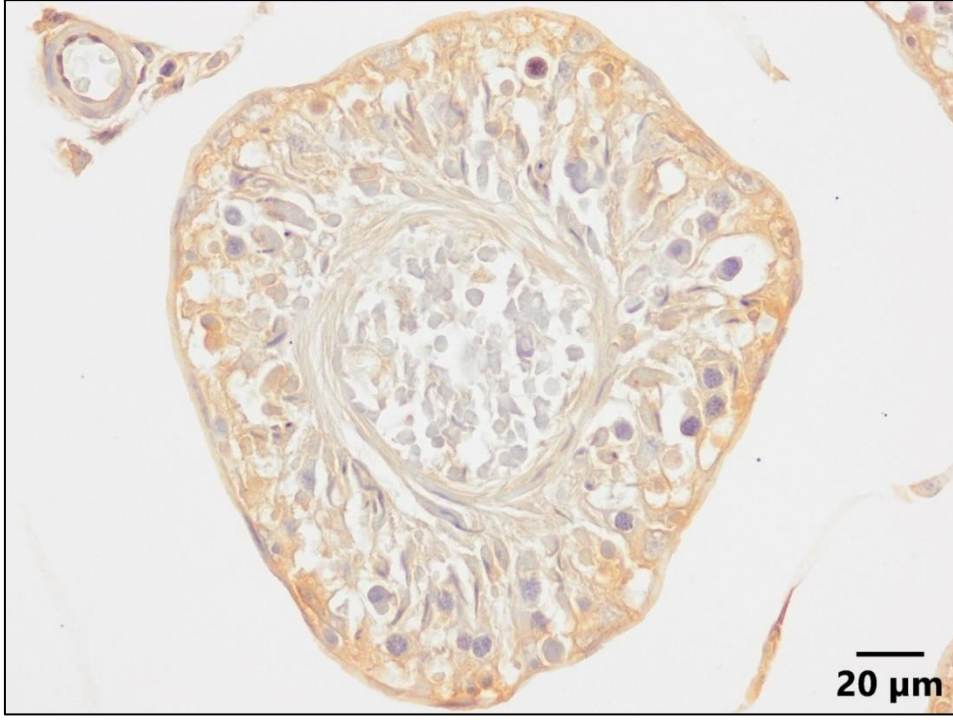
a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k : Farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS KMN-10: Sisplatin ve kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol Mg: Mısır yağı verilen kontrol grubu, Kontrol Sf: Serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Kontrol Sf Mg: Serum fizyolojik ve mısır yağı verilen kontrol grubu.

Gruplara göre % TUNEL pozitif tubulus oranı tablo 12’de verildi. Veriler incelendiğinde, % TUNEL pozitif tubulus oranının; SİS-5, SİS-10, SİS-15 gruplarında kontrol gruplarına göre, SİS KMN-10 grubunda ise bütün gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü.

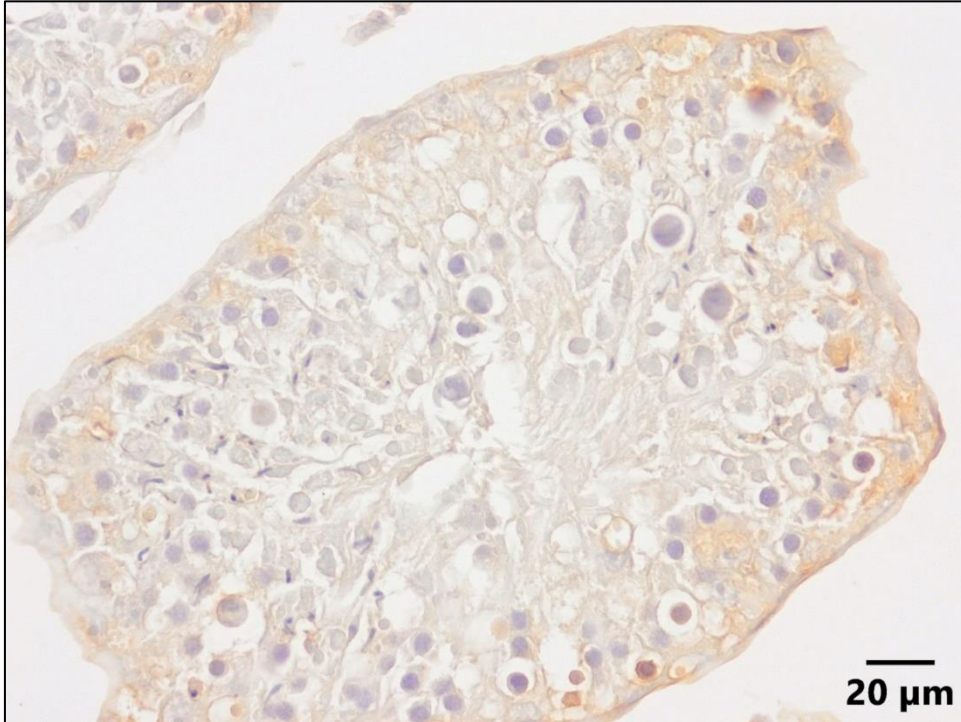
Tablo 12: % TUNEL pozitif tubulus oranı

| Grup | % TUNEL Pozitif Tubulus Değeri ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$) |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| SİS-5 | 49,66±1,85 ^b |
| KMN-5 | 27±1,73 ^a |
| SİS KMN-5 | 32±3 ^a |
| SİS-10 | 50,66±13,42 ^b |
| KMN-10 | 35±2 ^{a,b} |
| SİS KMN-10 | 100 ^d |
| SİS-15 | 71,66±4,09 ^c |
| KMN-15 | 22,5±2,5 ^a |
| Kontrol Mg | 19,33±2,02 ^a |
| Kontrol Sf | 19±3 ^a |
| Kontrol Sf Mg | 23,5±0,5 ^a |

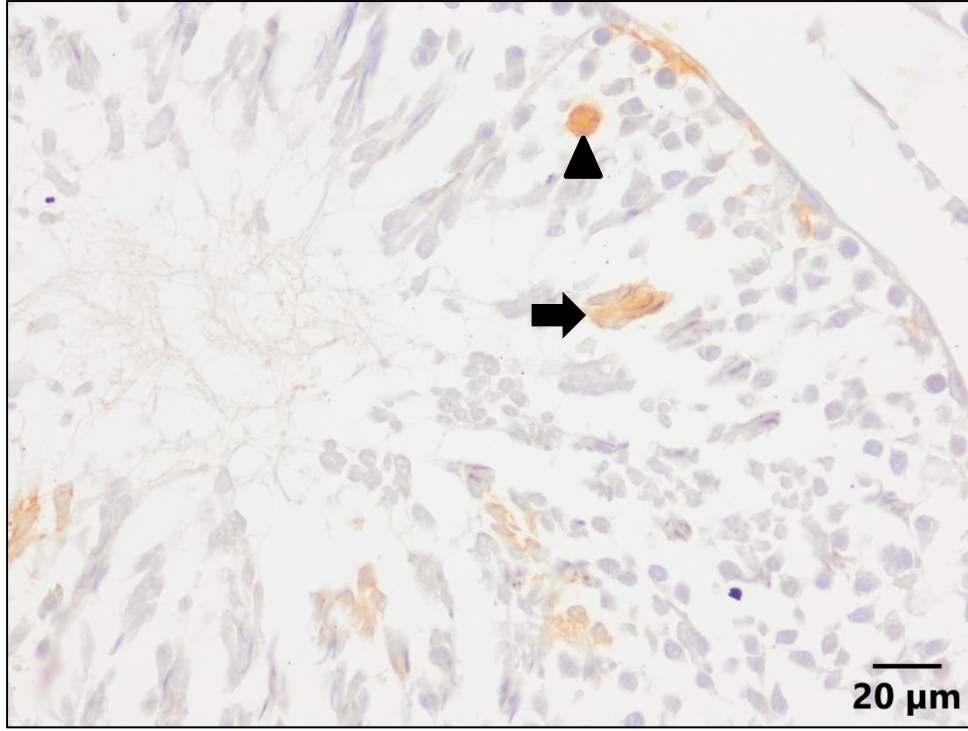
^{a,b,c,d} : Farklı harf taşıyan gruplar istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0,05). SİS 5: Sisplatin verilen 5 günlük grup, KMN 5: Kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS KMN-5: Sisplatin ve kurkumin verilen 5 günlük grup, SİS 10: Sisplatin verilen 10 günlük grup, KMN 10: Kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS KMN-10: Sisplatin ve kurkumin verilen 10 günlük grup, SİS 15: Sisplatin verilen 15 günlük grup, KMN 15: Kurkumin verilen 15 günlük grup, Kontrol Mg: Mısır yağı verilen kontrol grubu, Kontrol Sf: Serum fizyolojik verilen kontrol grubu, Kontrol Sf Mg: Serum fizyolojik ve mısır yağı verilen kontrol grubu.



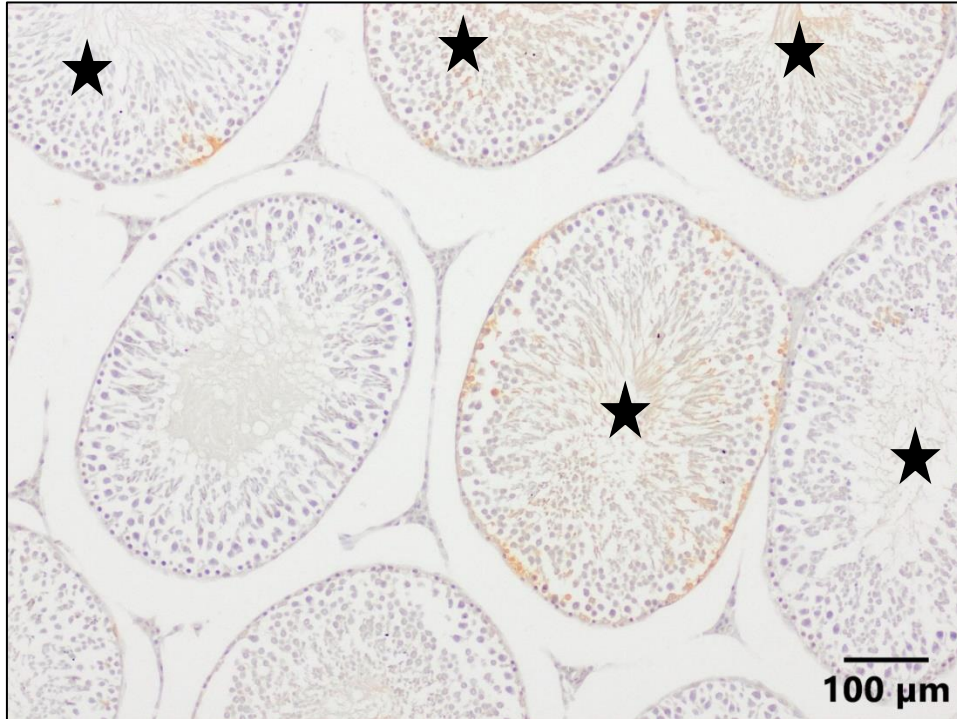
Resim 23: SİS KMN-10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesitinde apoptotik hücreler. Dejenere olmuş spermatogenetik seri hücrelerinde yaygın pozitivite görülmektedir. TUNEL metodu, Bar: 20 µm.



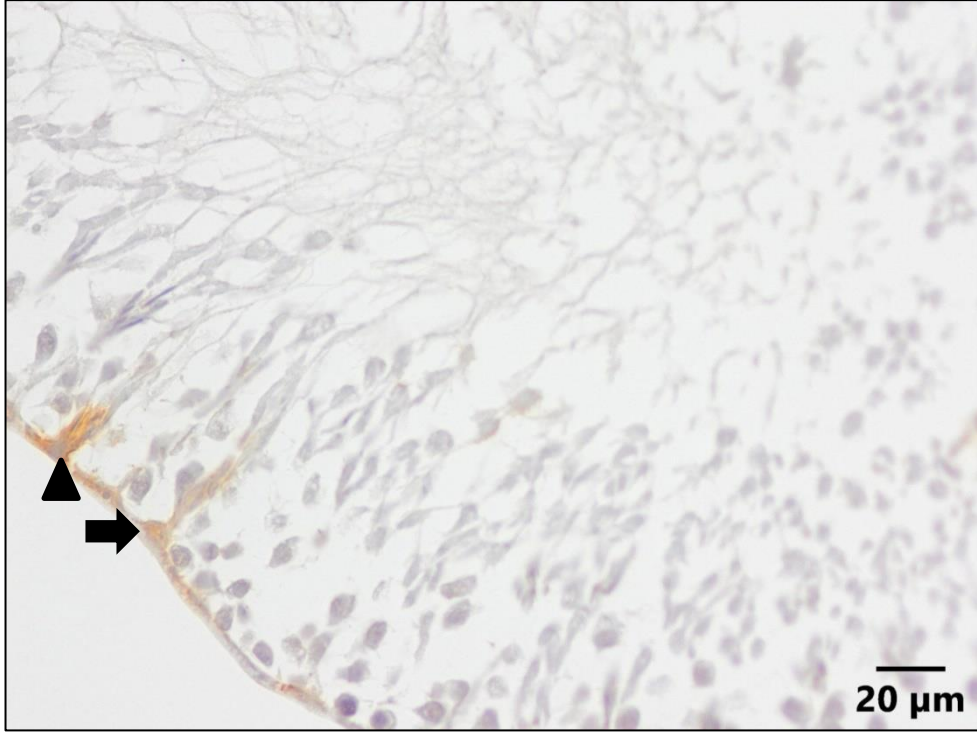
Resim 24: SİS KMN-10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesitinde apoptotik hücreler. Dejenere olmuş spermatogenetik seri hücrelerinde pozitivite görülmektedir. TUNEL metodu, Bar: 20 µm.



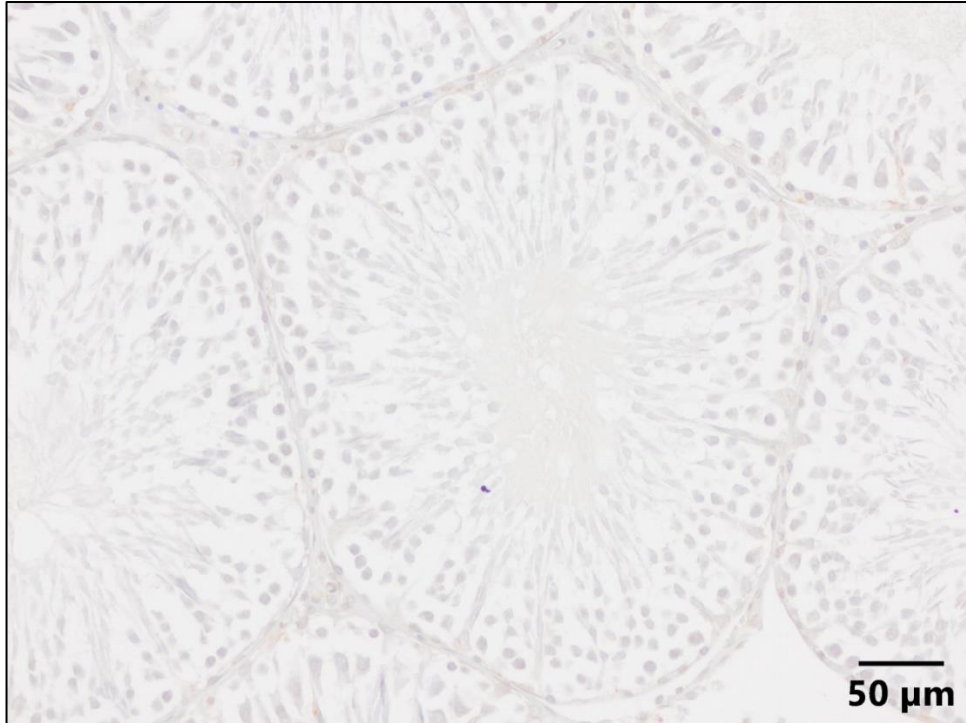
Resim 25: SİS-10 deney grubundan bir hayvana ait testis kesitinde apoptotik hücreler. Pozitif spermatozot (ok başı) ve pozitif uzamış spermatidler (ok) görülmektedir. TUNEL metodu, Bar: 20 µm.



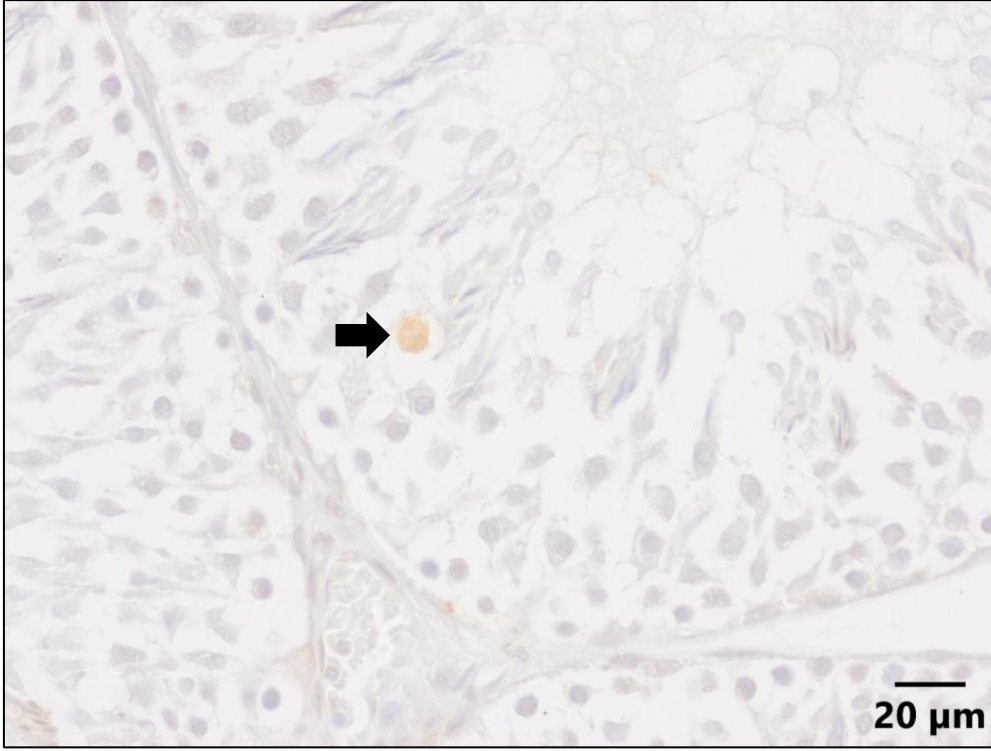
Resim 26: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait TUNEL pozitif seminifer tübüller (yıldız). TUNEL metodu, Bar: 100 µm.



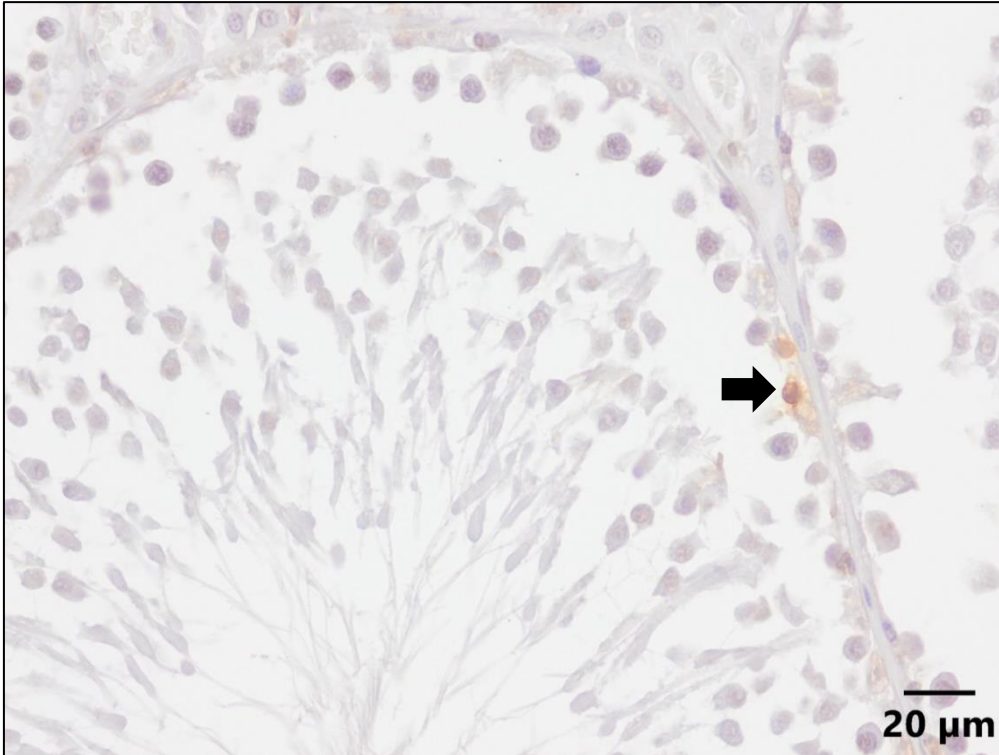
Resim 27: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait apoptotik hücreler. Sertoli hücresi (ok) ve pozitif uzamış spermatidler (ok başı) görülmektedir. TUNEL metodu, Bar: 20 µm.



Resim 28: Kontrol Sf grubundan bir hayvana ait TUNEL negatif seminifer tübüller görülmektedir. TUNEL metodu, Bar: 50 µm.



Resim 29: Kontrol Sf grubundan bir hayvana ait apoptotik hücre. Pozitif spermatosit (ok) görülmektedir. TUNEL metodu, Bar: 20 µm.



Resim 30: Kontrol Mg grubundan bir hayvana ait apoptotik hücreler. Pozitif spermatogonyum (ok) görülmektedir. TUNEL metodu, Bar: 20 µm.

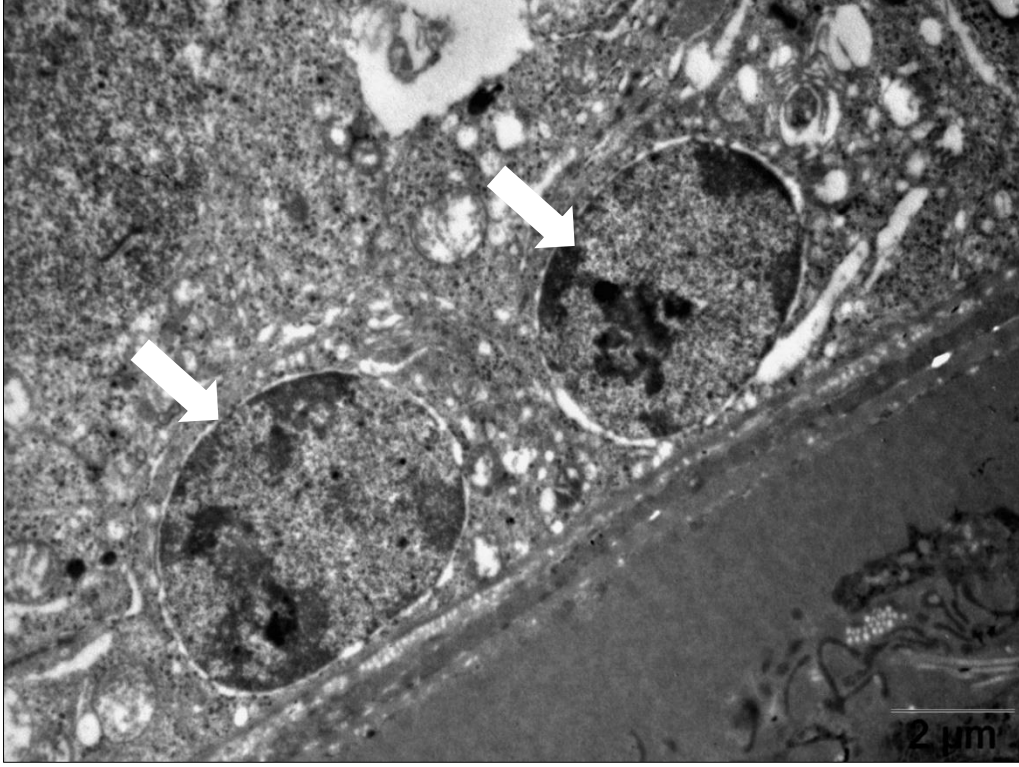
4.2. Elektron Mikroskopik Bulgular

Elektron mikroskopik incelemeler, deneysel uygulamalardan 15 gün sonra alınan örneklerde gerçekleştirildi.

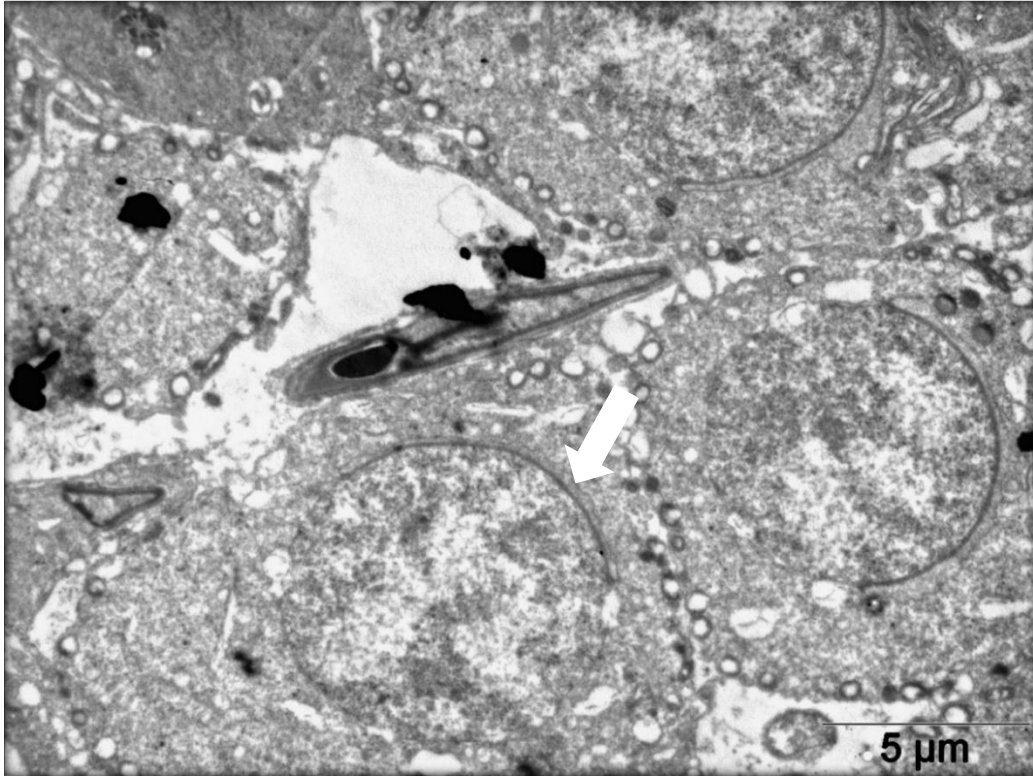
Kontrol grubuna ait sıçanların testislerinin yarı ince kesitlerinde bütün gelişim evrelerinde seminifer tübüllerin bazal ve adluminal kompartmanlarında bulunan hücreler histolojik (morfolojik) olarak normal görünümündü.

Kontrol grubuna ait ince kesitlerde spermatogenezin aşamaları ayrıntılı olarak izlendiğinde; bazal kompartmanda A ve B tipi spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri, adluminal kompartmanda primer ve sekonder spermatositler, lümene yakın kısımda ise; yuvarlak, uzayan, uzamış spermatidler ve spermatozoonların yer aldığı görüldü.

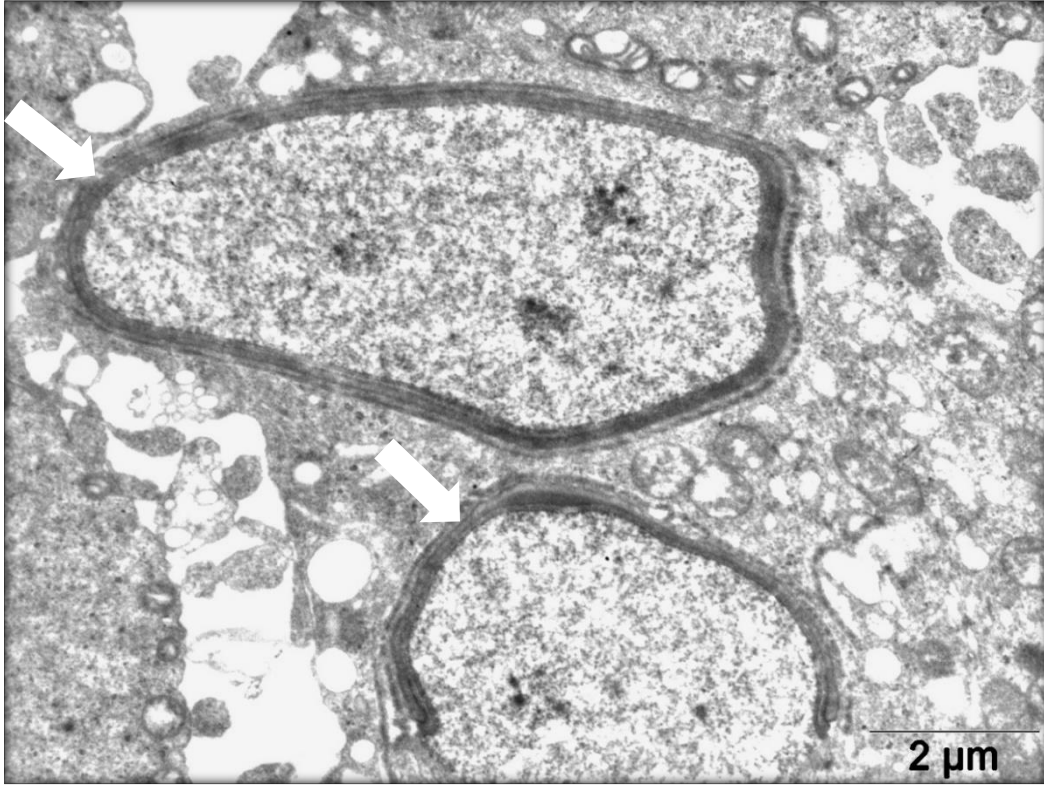
Kontrol grubu mikrografları incelendiğinde I. evreden V. evreye kadar gelişimlerinin çeşitli aşamalarında izlenebilen spermatogonyumlardan kök hücre tabiatlı olan koyu görünümlü A tipi spermatogonyumlar oval ve heterokromatik çekirdekleriyle, soluk görünümlü A tipi spermatogonyumlar ise ökromatik çekirdekleriyle ayırdedilmekteydi. Yuvarlak çekirdeklere sahip B tipi spermatogonyumlardan oluşan primer spermatositler ise geniş vezikül görünümlü çekirdeklere sahipti (Resim 31). I-VIII. evrelerde, spermiyogenez sürecindeki yuvarlak spermatidlerde Golgi cisimciğinden akrozom oluşumunun aşamaları izlenmektedir (Resim 32). VII. evrede yuvarlak spermatidlerin akrozom yayları spermatid başının yarısını kaplayacak kadar genişlemişti (Resim 32). IX, X ve XI. evrelerde gözlenen uzayan spermatidlerde, spermatid başının oval şekil almasıyla dikkat çekmektedir. (Resim 33). Uzamış spermatidlerde ise kondensasyonun tamamlandığı görüldü. Bu hücreler belirgin bir nukleolusa ve bazaldan adluminal kompartmana uzanan geniş bir sitoplazmaya sahip Sertoli hücrelerinin derin kriptaları arasında gömülü bulunmaktaydı. Yalnızca VII ve VIII. evrede izlenebilen spermatozoonlar ise baş, boyun ve kuyruk yapılarıyla dikkat çekmektedir (Resim 34). Bu evrelere ait ince kesitlerde lümende spermatozoonlara ait kuyruk kesitleri, baş yapıları ve residual cisimler izlendi (Resim 35).



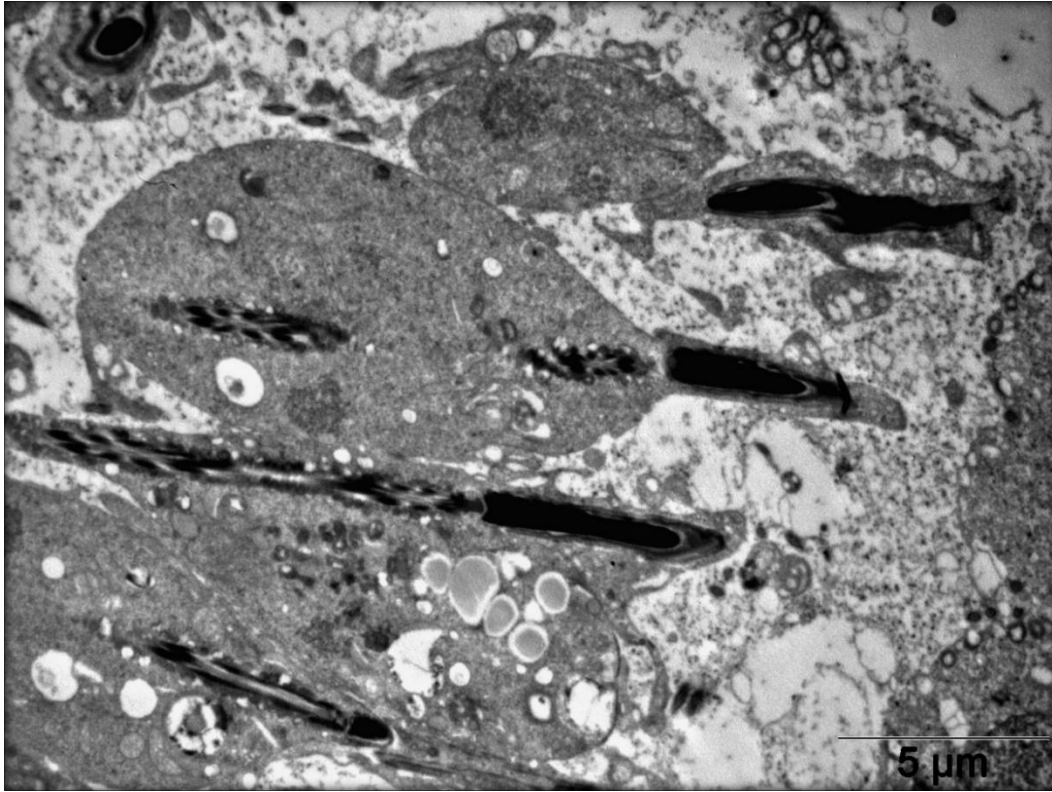
Resim 31: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografi. B tip spermatogonyum (ok). Bar: 2 µm.



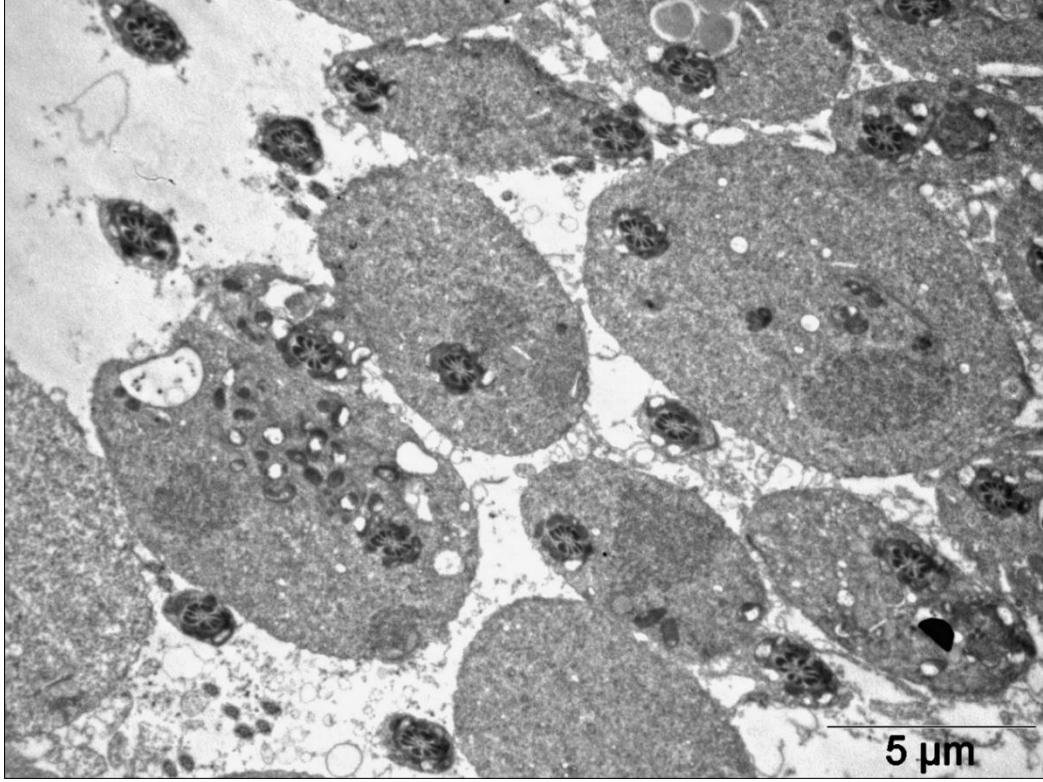
Resim 32: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografi. VII. Evre yuvarlak spermatid akrozom (ok). Bar: 5 µm.



Resim 33: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografi. X. Evre uzayan spermatid (ok). Bar: 2 μm.



Resim 34: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografi. VII. Evre lümende spermatozonlar. Bar: 5 μm.



Resim 35: K-Sf grubuna ait testis elektron mikrografı. VII. evre lümen Bar: 5 µm.

Sisplatin uygulamasının 15. gününde (SİS-15) sıçanların testislerinden alınan ince kesitler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; gelişim evrelerinin bir çoğunda bazal kompartman hücreleri arasında interselüler mesafenin arttığı ve hücreler arası ayrılımların olduğu izlendi.

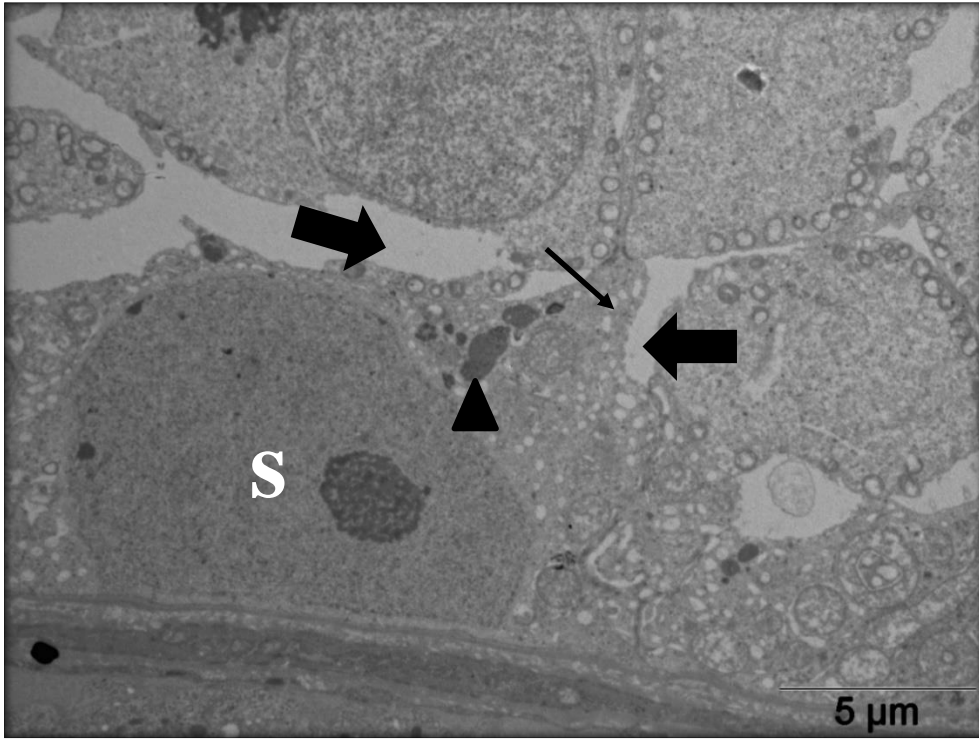
Bu grupta özellikle Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seri hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinin bozulduğu görüldü. Adluminal kompartmanda bulunan hücreler arasına uzanan Sertoli hücrelerinin sitoplazmik uzantıları içerisinde vakuolizasyon dikkat çekti. Yine Sertoli hücrelerinde sitoplazmada lipofuskin granüllerinde artış izlendi (Resim 36).

Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seri hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinde bozulma neticesinde gerçekleşen interselüler mesafedeki artış spermatositler arasında da görüldü. Aynı kesitte sekonder spermatositte lipofuskin granüllerinde artış dikkat çekti. Primer spermatositlerde de lipofuskin granüllerinde artış ile birlikte çekirdeğin parçalanması ile karakterize nekrozun karyoreksis aşaması izlendi (Resim 37).

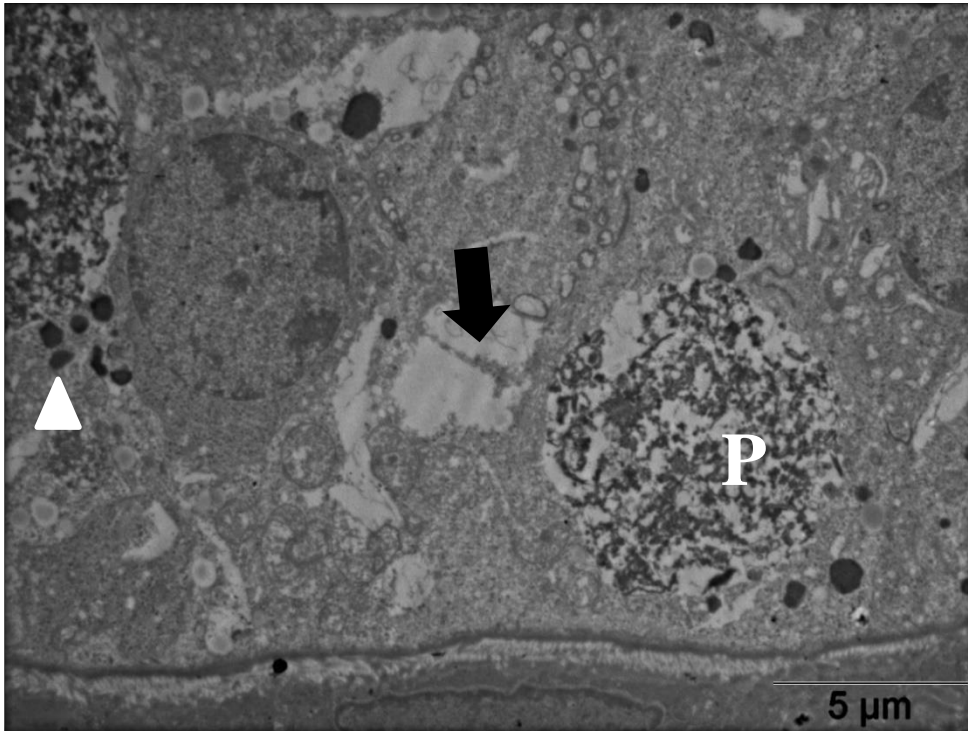
Ayrıca adluminal kompartmanda bulunan yuvarlak spermatid ve spermatositler arasında da interselüler mesafede artış ve sitoplazmada vakuolizasyon izlendi. Yine aynı kesitte yuvarlak spermatidlerde plazma membranı etrafında dizilmiş mitokondrilerde krista kaybı dikkat çekti (Resim 38).

Primer spermatositlerde görülen nekrozun haricinde, bazal kompartmanda bulunan 2 hücrenin, hücre lizisi neticesinde nekrozun ileri aşamalarında olduğu görüldü (Resim 39).

Nekrozun ileri aşamasında olan başka bir spermatosit lümende yuvarlak spermatid ile birlikte görüldü (Resim 40).



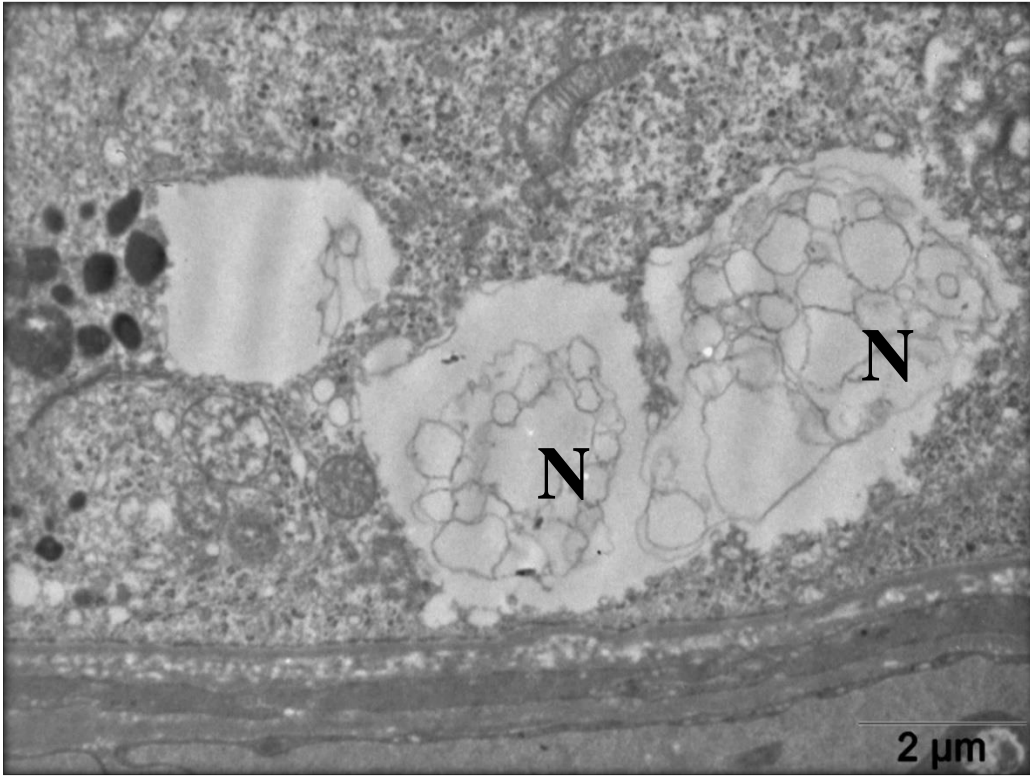
Resim 36: SİS-15 deney grubuna ait testis elektron mikrografı. Sertoli hücreleri (S) ve spermatogenetik seri hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinde bozulma (oklar), Sertoli hücresinde lipofuskin granülleri (ok başı) ile birlikte Sertoli hücre uzantılarında vakuolizasyon (ince ok) görülmektedir. Bar: 5 μ m.



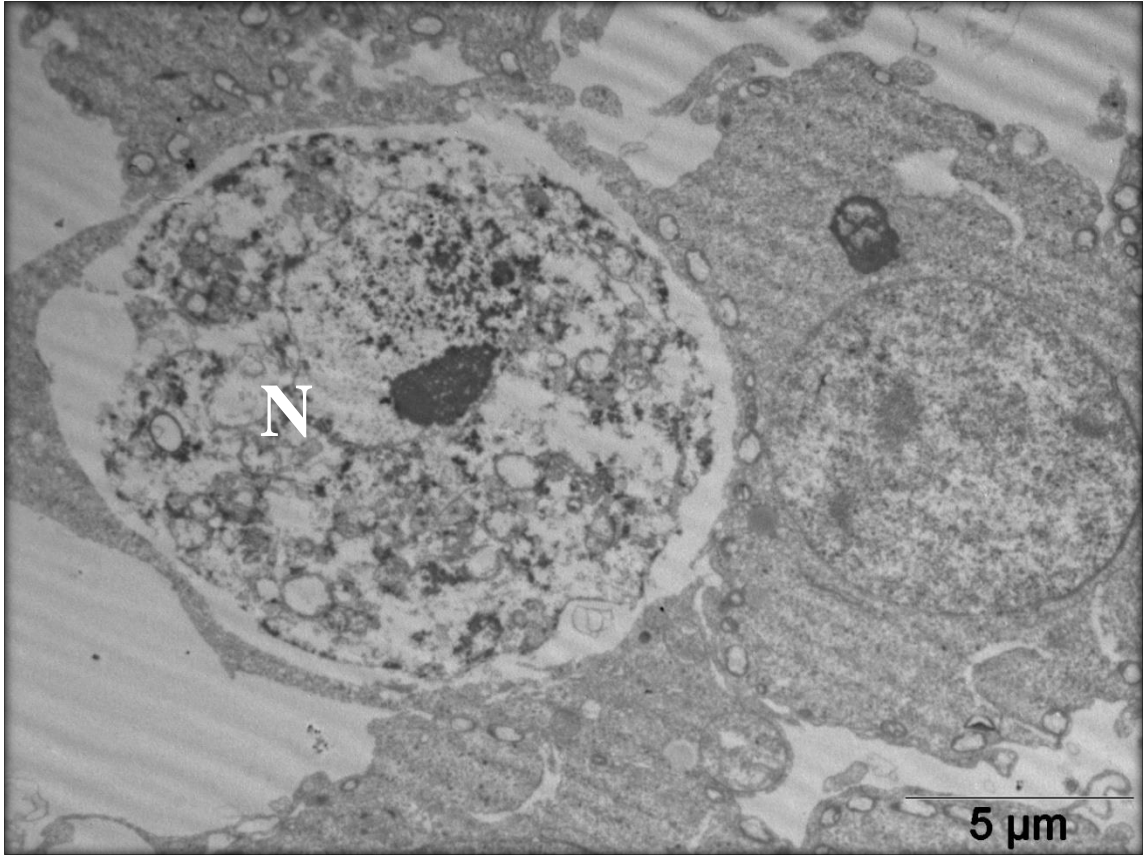
Resim 37: SİS-15 deney grubuna ait testis elektron mikrografı. Spermatogenetik seri hücreleri arasında ayrılma (ok), primer ve sekonder spermatositlerde lipofuskin granülleri (ok başı), nekrotik primer spermatosit (P). Bar: 5 μ m.



Resim 38: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait adluminal kompartman elektron mikrofafi. görüntüsü. İnterselüler mesafede artış (ok) görölmektedir. Bar: 5 µm.



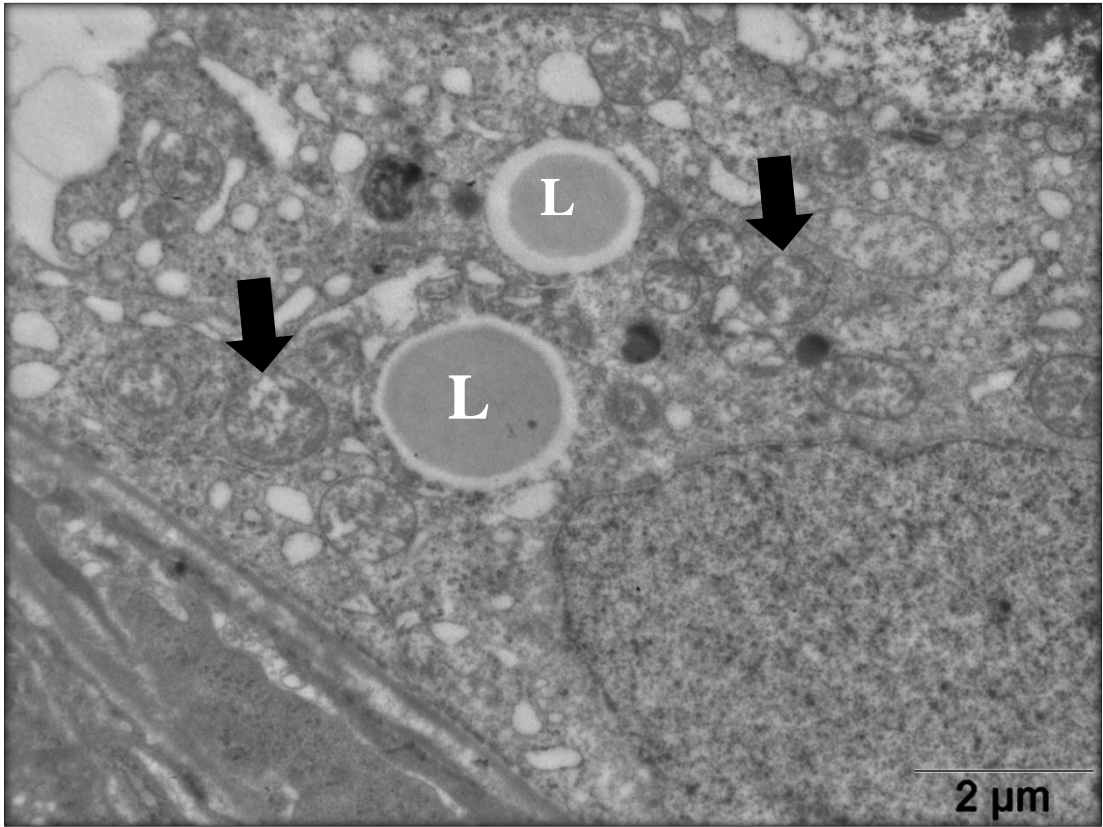
Resim 39: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait adluminal kompartman elektron mikrofafi. Nekrotik hücreler (N). Bar: 2 µm.



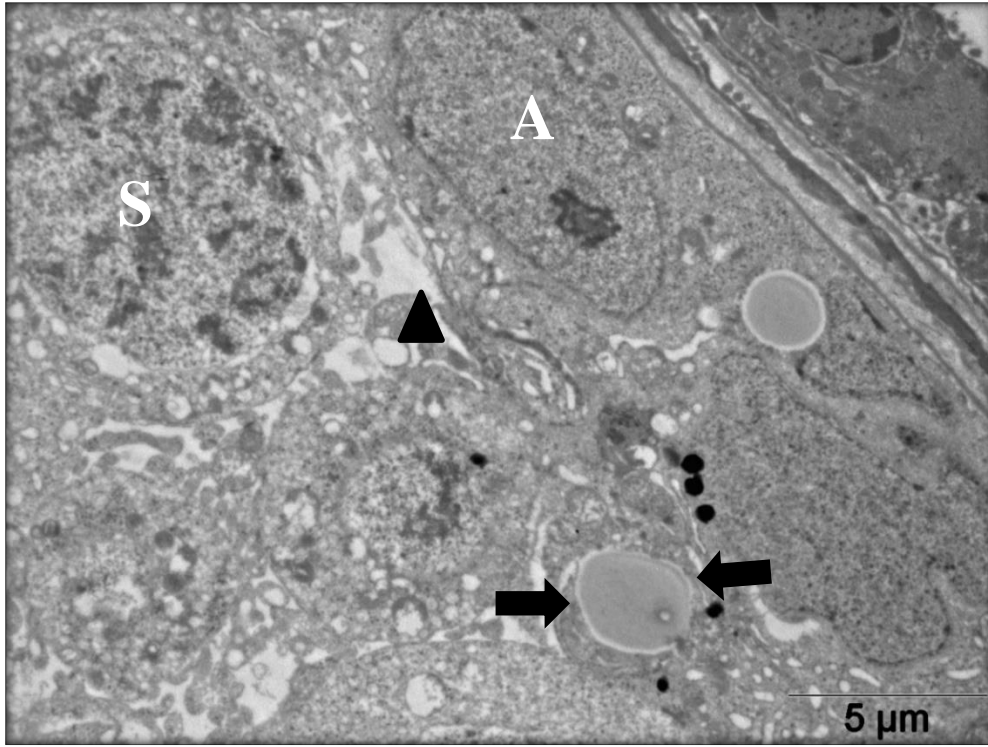
Resim 40: SİS-15 deney grubundan bir hayvana ait adluminal kompartman elektron mikrofrafı. Nekrotik hücreler (N). Bar: 5 µm.

KMN-15 deney grubundaki hücreler incelendiğinde; bazal kompartmanda bulunan spermatogonyuma ait mitokondrilerde şişkinlik ve lipid damlacıklarında artış dikkat çekti (Resim 41,43). Bazal kompartmana ait farklı bir bölgede soluk A tip spermatogonyum ve spermatositler arasında interselüler mesafede artış ve yoğun vakuolizasyon görüldü (Resim 42,43). Endoplazmik retikulum, mitokondri, lipofuskin granülleri ve lipid damlacığını içeren apoptotik cisim dikkat çekti (Resim 42).

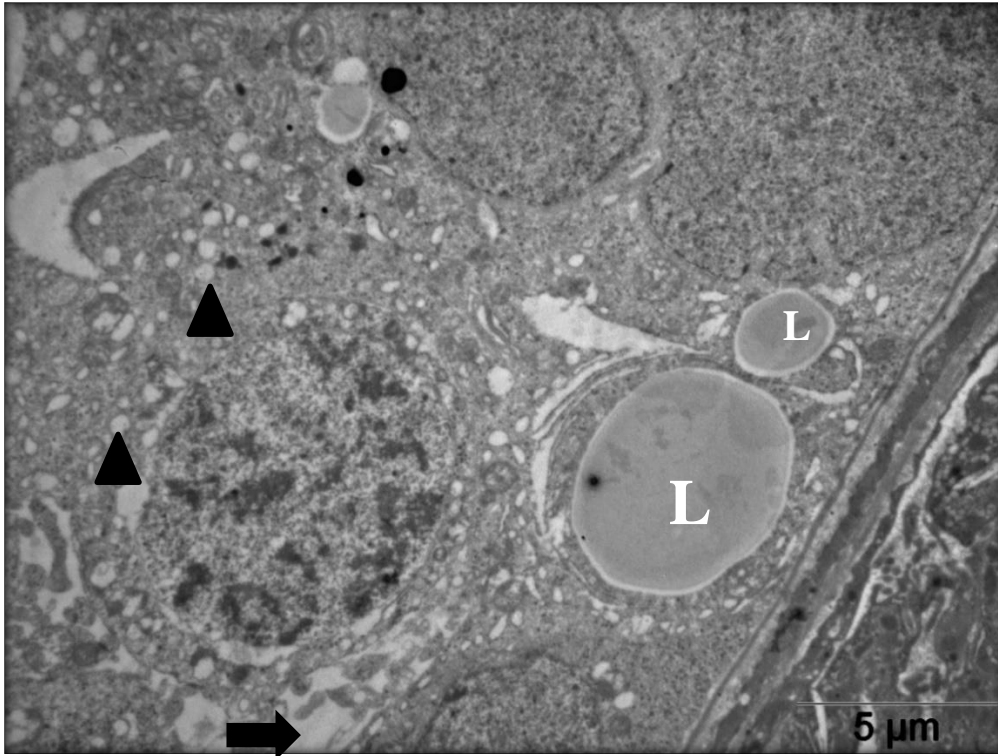
Adluminal kompartmana ait mikrograflar incelendiğinde primer spermatosit sitoplazmasında vakuolizasyon artışı ile birlikte sıkı bağlantı bölgelerinin bozulması dikkat çekti (Resim 44). XI. evreye ait ince kesitlerde uzayan spermatidlerin sitoplazmasında vakuolizasyon ve lipofuskin granüllerinde artış izlendi (Resim 45).



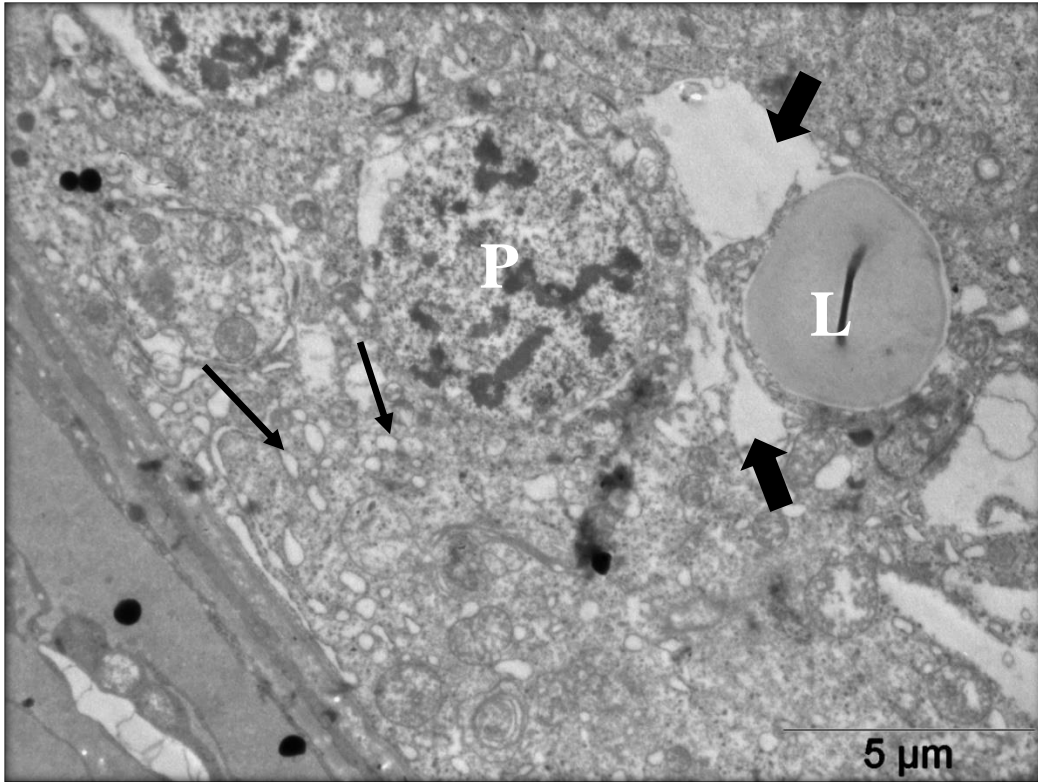
Resim 41: KMN-15 grubu bazal kompartmanda bulunan spermatogonyumun elektron mikrografı. Lipid damlacıkları (L) ve mitokondrilerde şişkinlik (ok) görülmektedir. Bar: 2 µm.



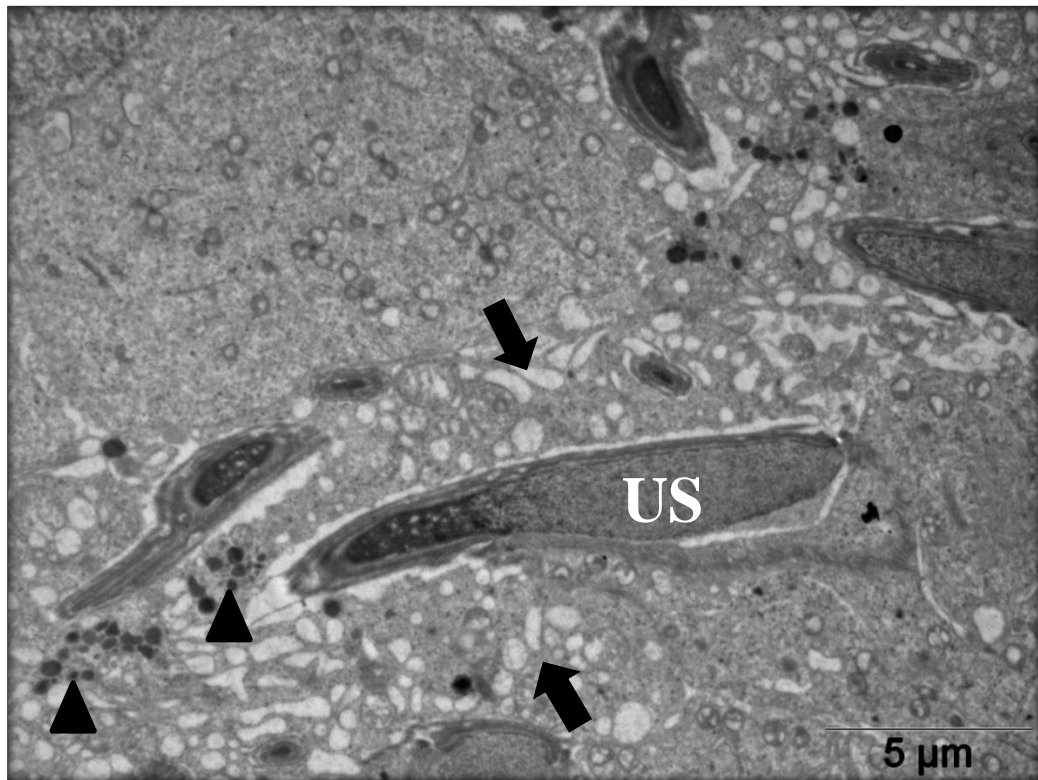
Resim 42: KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. Apoptotik cisim (oklar), A tipi spermatogonyum (A) ve spermatosit (S) arasında interselüler mesafede artış (ok başı) görülmektedir. Bar: 5 μ m.



Resim 43: KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. Spermatogonyumda lipid granülleri (L), spermatogonyum ve primer spermatositler arasında ayrılma (ok), primer spermatosit sitoplazmasında vakuolizasyon (ok başı) görülmektedir. Bar: 5 μ m.



Resim 44: KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. Lipid damlacıkları (L), primer spermatosit (P), bağlantı komplekslerinde bozulma (ok), vakuolizasyon (ince ok) görülmektedir. Bar: 5 µm.

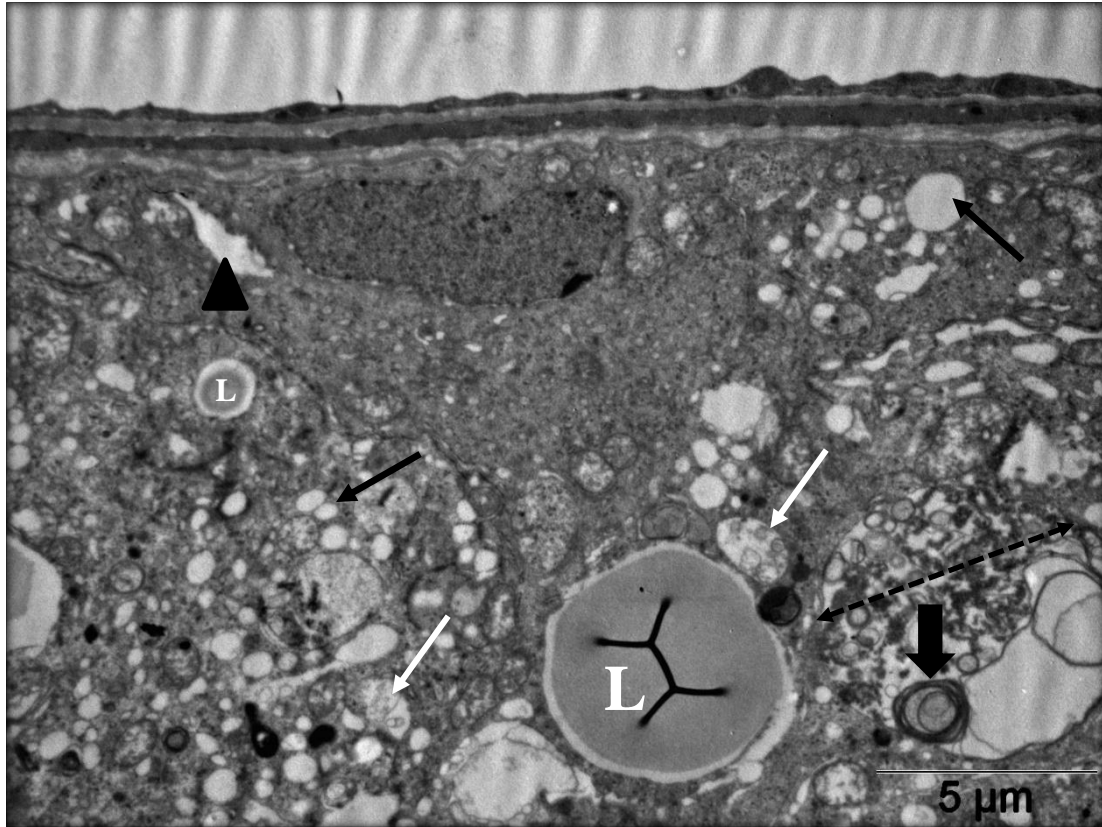


Resim 45: KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. Uzayan spermatidler (US), vakuolizasyon (ok) ve lipofuskin granülleri (ok başı) görülmektedir. Bar: 5 µm.

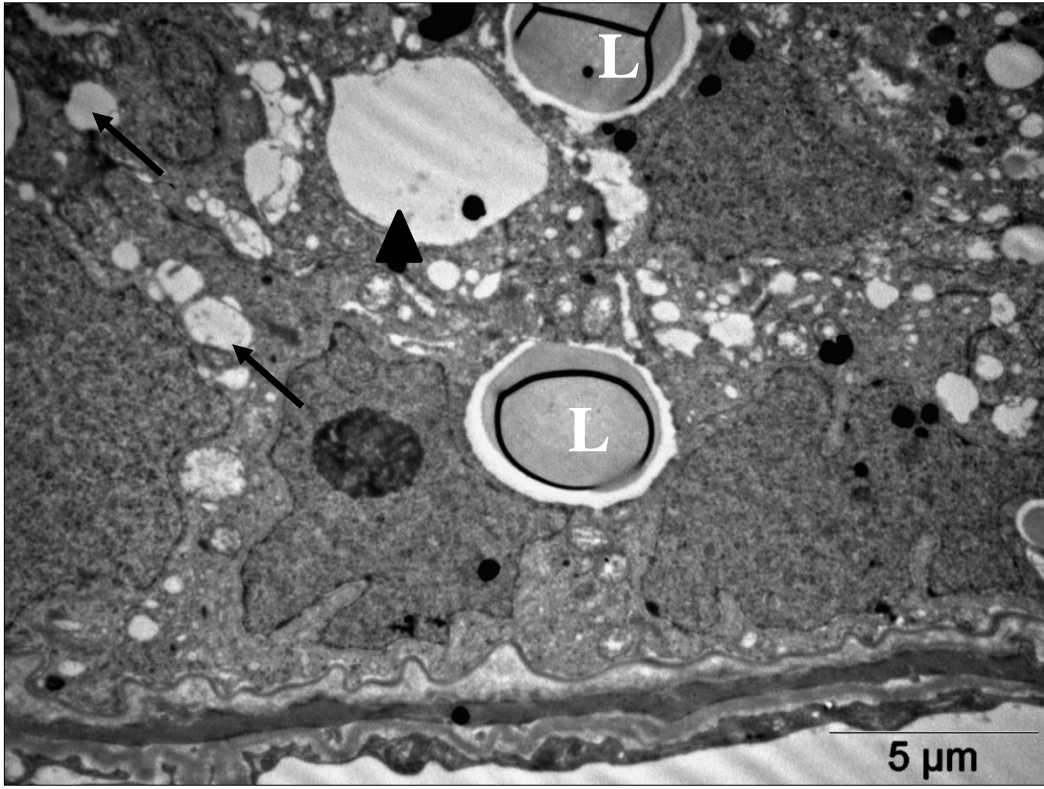
Sisplatin Kurkumin-15 deney grubuna ait ince kesitler incelendiğinde, daha çarpıcı bir tablo ile karşılaşıldı.

Bazal kompartmana ait hücrelerde dramatik değişiklikler meydana geldiği görüldü. Bu hücrelerde hücreler arası ayrılmalara ek olarak, sitoplazmada multilamellar cisim oluşumu, mitokondride krista kaybı ile görülen dejenerasyon, otofajik vakuoller, vakuolizasyonda ve lipid damlacıklarında fazla miktarda artış olduğu dikkat çekti (Resim 46, 47).

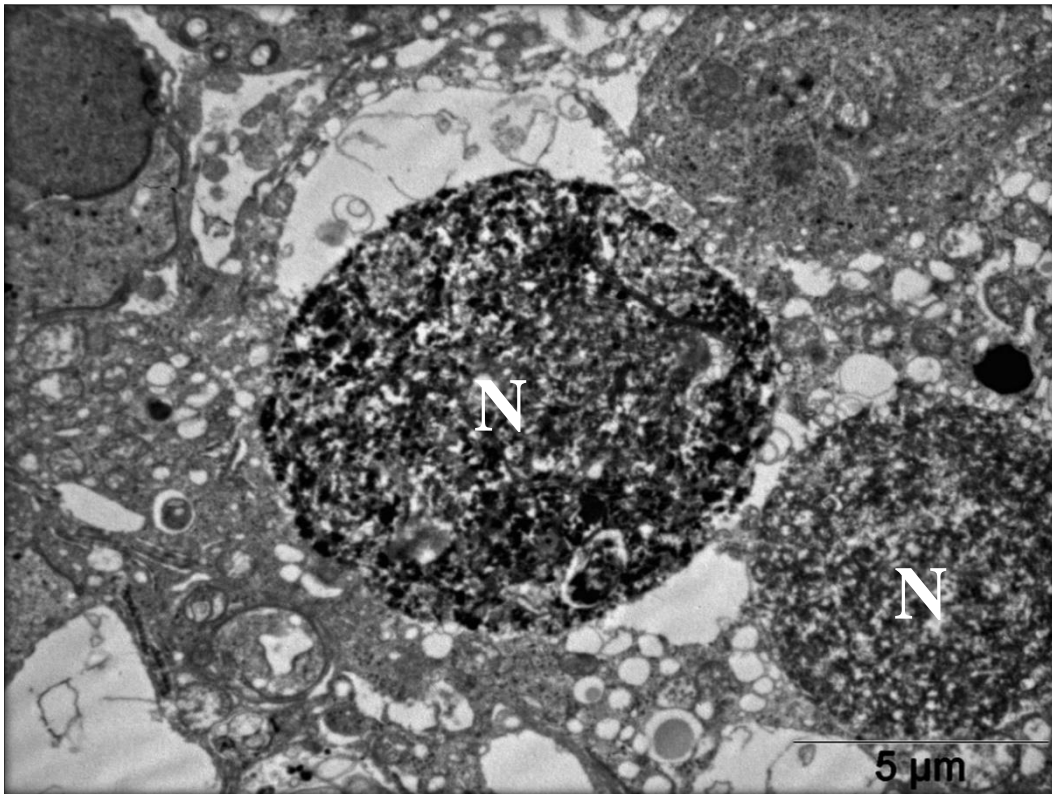
Adluminal kompartmana ait ince kesitler incelendiğinde; yine vakuolizasyon artışı ve hücreler arası bağlantı komplekslerinde bozulma neticesinde hücreler arası ayrılma yoğunu. Aynı bölgede nekrotik hücreler mevcuttu (Resim 48). Yuvarlak spermatidlerde multilameller cisim oluşumu, mitokondrilerde krista kaybı ile görülen dejenerasyon ve endoplazmik retikulumda hipertrofi ile birlikte, lipid damlacıklarında sayıca artış ve membranla sarılı organelleri içeren apoptotik cisimler dikkat çekti (Resim 49, 50).



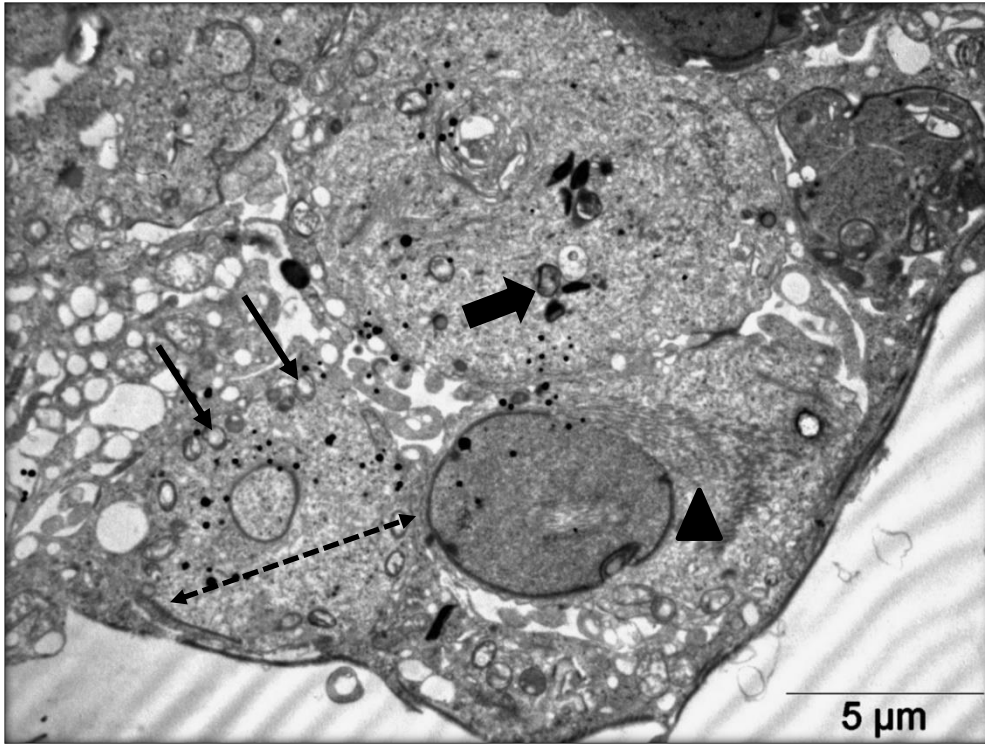
Resim 46: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. Lipid damlacıkları (L), hücreler arasında ayrılma (ok başı), multilameller cisim (ok), mitokondrilerde krista kaybı (ince ok), vakuolizasyon (siyah ince ok), otofajik vakuol (kesik çizgi) görülmektedir. Bar: 5 µm.



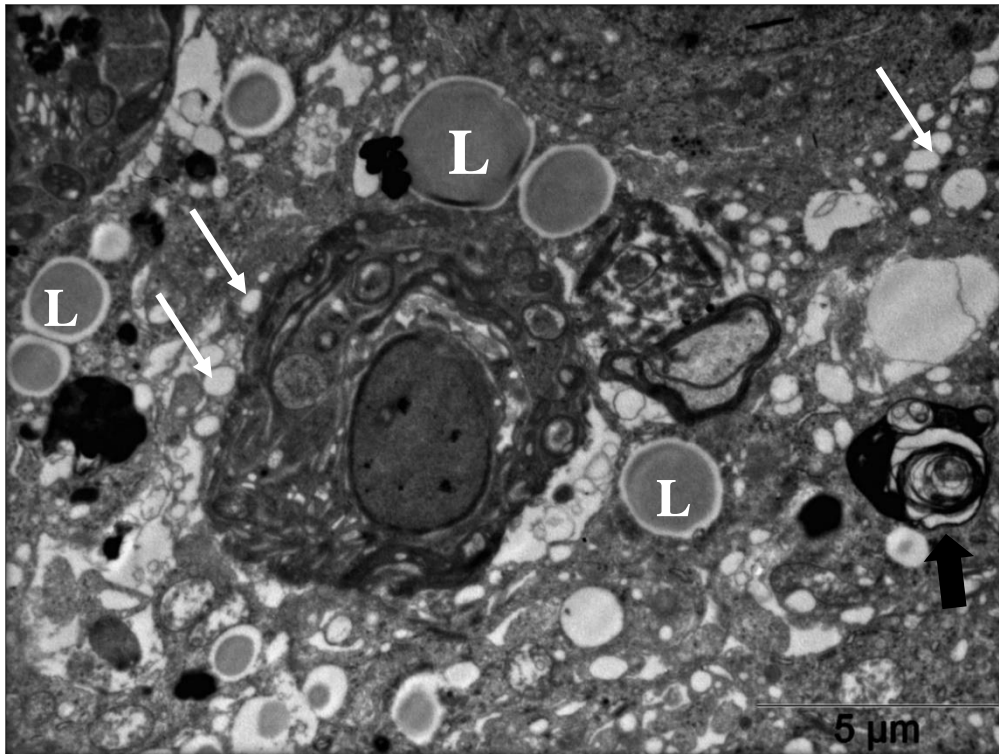
Resim 47: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. Lipid damlacıkları (L), hücreler arasında ayrılma (ok başı), vakuolizasyon (siyah ince ok), görülmektedir. Bar: 5 µm.



Resim 48: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. Nekrotik hücreler görülmektedir. Bar: 5 µm.



Resim 49: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. Multilameller cisim (ok), mitokondrilerde krista kaybı (ince ok), endoplazmik retikulumda hipertrofi (ok başı) apoptotik cisim (kesik çizgi) görülmektedir. Bar: 5 µm.



Resim 50: SİS KMN-15 deney grubu testis elektron mikrografı. Multilameller cisim (ok), lipid damlacıkları (L), vakuolizasyon (ince ok) görülmektedir. Bar: 5 µm.

5. TARTIŞMA

5.1. Ağırlık Analizi ve Histometrik Değerlendirme

Ateşşahin ve arkadaşları (2006) yapmış oldukları çalışmalarında sisplatinle uyarılmış spermiyotoksisitenin üzerine likopenin olası koruyucu etkilerini kantitatif, biyokimyasal histopatolojik olarak incelemeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmada her grupta 6 sıçan olmak üzere 24 adet sıçan dört gruba ayrılmıştır. İlk gruba 10 gün mısır yağı oral yolla verildikten sonra tek doz serum fizyolojik (1 ml) ip yolla enjekte edilmiştir. İkinci gruba 10 gün mısır yağı oral yolla verildikten sonra 7 mg/kg sisplatin ip yolla enjekte edilmiştir. Üçüncü gruba 10 gün 4 mg/kg likopen oral yolla verildikten sonra 7 mg/kg tek doz sisplatin ip yolla enjekte edilmiştir. Son gruba ise 7 mg/kg tek doz sisplatin ip yolla enjekte edildikten sonra likopen 5 gün gavaj yoluyla uygulanmıştır. Sıçanlar sisplatin uygulandıktan 5 gün sonra dekapite edilmiştir. Tüm deney gruplarında hem sağ hem de sol testis ağırlıkları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Seminifer tübül çapları ise yalnızca sisplatin verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise, bu çalışmanın aksine uygulamanın 5. gününde (SİS-5, SİS KMN-5) alınan testislerin ağırlıklarının kontrollere göre arttığı görüldü. Uygulamanın 10 ve 15. günlerinde ise (SİS KMN-10 ve SİS KMN-15) testis ağırlıklarının kontrollere göre azaldığı gözlemlendi. Bizim çalışmamızın seminifer tubulus çap ölçüm sonuçlarına göre SİS-10, SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 deney gruplarında tubulus çaplarının diğer gruplara göre daraldığı ve bu daralmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü.

Bir çalışmada sisplatin kaynaklı testis toksisitesi üzerine eugenolun antiapoptotik ve antioksidant etkileri araştırılmıştır (Ekinci Akdemir ve ark, 2019). Bu çalışmada sprague Dawley sıçanlara tek doz 15 mg/kg sisplatin ip yolla enjekte edilmiş ve hayvanlar 72 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Çalışmada sisplatin grubunda toplam testis ağırlığında anlamlı derecede düşüş bulunmuştur. Bizim çalışmamızda karşılaştırıldığında bu çalışmada gerek verilen doz miktarı gerekse hayvanların sakrifiye edildiği gün açısından farklılık bulunmaktadır. Nitekim bizim çalışmamızda sisplatin uygulamasının 5. gününde testis ağırlıklarında düşüşten ziyade kontrollere göre bir artış bulunmuştur.

5.2. Apoptozis ve Histokimyasal Değerlendirme

Mesane kanserinin sisplatine direnci başarılı bir tedavinin önünde bir engeldir. Park ve ark. (2016) 253J-Bv (p53 wild-type) ve T24 (p53 mutant) insan mesane kanseri hücre hatları üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında sisplatinin kurkumin ile birlikte tedavisinin apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, kurkumin ve sisplatin ile birlikte tedavinin birincil olarak ROT'u ve mesane kanserinde apoptozise giriş sırasında ekstraselüler regulated kinaz (ERK) sinyalini hedeflediği bulunmuştur. Sisplatinle tedaviye maruz kalan hücrelerle karşılaştırıldığında, kurkumin ve sisplatin ile birlikte tedavi edilen 253J-Bv ve T24 hücrelerinde apoptozis oranı artmıştır. Ayrıca, kurkumin ve sisplatin ile birlikte tedavi edilen her iki hücrede p-MEK ve p-ERK1/2 sinyalinin upregülasyonunun kaspaz-3 aktivasyonu ve ROS üretimini indüklediği bildirilmiştir. Aynı çalışmada ERK inhibitörleri (NAC ve UO126) uygulamasının kurkumin ve sisplatin tarafından indüklenen apoptozu inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca, 253J-Bv hücreleri kurkumin ve sisplatinle birlikte tedavi edildiğinde, hücre döngüsü düzenleyici proteinleri olan p53 ve p21 ekspresyon seviyelerinin kontrole nazaran belirgin olarak arttığı bildirilmiştir. 253J-Bv hücrelerinden farklı olarak, T-24 hücrelerinin kurkumin ve sisplatinle birlikte tedavi edildiğinde p-sinyal çevirici ve transkripsiyon 3 aktivatörünün (STAT3) downregülasyonu yoluyla apoptoza girdiği görülmüştür. Bundan başka, UO126 ile ön muamelenin kurkumin ve sisplatinin indüklediği p53, p21 ve p-STAT3'ün upregülasyonunu ve hayati önem taşıyan proteinlerin down regülasyonunu baskıladığı her iki hücre tipinde de gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, kurkumin ve sisplatinin birlikte tedavisinin mesane kanserinde ERK1/2'nin ROS-aracılı aktivasyon yoluyla apoptozu etkileşimli olarak indüklediği bildirilmiştir. Kanser hücre hatlarıyla yapılmış olan bu çalışma tezimizin sisplatin-kurkumin deney grubunun artmış apoptoz oranlarındaki TUNEL bulgularıyla uyumluluk göstermekle birlikte bu çalışmada normal hücrelerdeki etkisi gösterilmemiştir. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızın bulguları önem arz etmektedir.

Boroja ve arkadaşları 2018 yılında yaptıkları çalışmada karaciğer, böbrek ve testiste sisplatin tarafından indüklenmiş oksidatif hasara karşı geyik otu olarak bilinen *Satureja hortensis* bitkisinin düzenleyici etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada ilk 5 gün antioksidan uygulamasından sonra sisplatin enjeksiyonu yapılmış ve 5 gün daha antioksidan verilmeye devam edilmiştir. En son uygulamadan 24 saat sonra sıçanlar dekapite edilmiştir. Apoptozisle ilişkili proteinler olan Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarına bakılmıştır. Bu sonuçlara göre sisplatin grubunda Bax protein ekspresyonu anlamlı ölçüde artmıştır. Diğer taraftan farklı dozlarda

antioksidan verilen gruplarda karaciğer, böbrek ve testis dokularında Bax seviyesi anlamlı ölçüde düşmüştür. Bcl-2 gen ekspresyonu ise sisplatin grubunda her üç dokuda düşmüştür. Bu çalışmanın sonuçları, antioksidan ile tedavinin Bcl-2'nin gen ekspresyonundaki artışıyla kanıtlanan sisplatin kaynaklı apoptozise karşı koruyucu etkilerinin olduğunu göstermiştir. Bizim çalışmamızın sonuçlarında da SİS-10 ve SİS-15 gruplarında apoptozis anlamlı derece artmasına rağmen, kurkuminin verilmesi apoptozis atışını daha da şiddetlendirmiştir.

Yine aynı çalışmanın histopatolojik bulgularında sisplatin ile birlikte antioksidan verilen grupların testis doku örneklerinde seminifer tübüller ve Sertoli hücrelerinde hafif derecede dejenerasyon bulunduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızdaki histopatolojik sonuçlarla karşılaştırıldığında, sisplatin ile birlikte antioksidan verilen grupta dejenerasyonun görülmesi benzerlik göstermiştir. Her ne kadar çalışmamızın SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 deney gruplarında dejenerasyon daha şiddetli olsa da Boroja ve ark. (2018)'nin çalışmalarında antioksidanın sisplatin enjeksiyonundan önce verilmesinin koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir.

Mercantepe ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada amifostine, kurkumin ve kafeik asit fenil ester (CAPE) gibi antioksidanların sisplatin kaynaklı testis hasarındaki yararları incelenmiştir. Bu çalışmada 5 mg/kg sisplatin enjeksiyonundan 24 saat önce bir kez 100 mg/kg kurkumin verilmiş ve 7. günün sonunda hayvanlar kurban edilmiştir. Bu çalışmanın ışık mikroskopik sonuçlarında sisplatin grubunda seminifer tübülde germinal epitel hücreleri kaybına bağlı olarak testis dokusunda yaygın olarak ödem görüldüğü, yoğun kromatin içeren atipik çekirdeğe sahip spermatogonyumların varlığı ve spermatositler arasındaki bağlantının bozulduğu, spermatozoa ve spermatidlerin kontrol grubuna göre sayılarının daha az olduğu, seminifer tübüllerin bazal laminasında dejenerasyon ve interstisyel aralıkta yoğun hiyalinizasyon olduğu bildirilmiştir. Sisplatin+kurkumin grubunda ise seminifer tübüllerde epitel hücreleri arasında az miktarda vakuolizasyon olduğu, spermatogonyum ve spermatidlerin normal görüldüğü, spermatozoanın sisplatin grubuna göre sayıca daha fazla, interstisyel aralıkta hiyalinizasyonun daha az olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda ise SİS-5 grubunda dejeneratif değişiklikler çok belirgin değilken, SİS-15 grubunda bu dejeneratif değişikliklerin daha çarpıcı olduğu görülmüştür. Fakat Mercantepe ve ark. (2018)'nin bulgularının aksine, bizim çalışmamızda SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 deney gruplarında sisplatin bulgularının daha da şiddetlenerek, hücre kayıplarına bağlı hücreler arası ayrılmalar, lümende hücre döküntüleri, spermatogenetik arrest, apoptotik hücreler, spermatosit kromatininde yoğun (dens) görünüm, tübüler sınırları belirleyen tunika albuginea tabakasının düzensiz hal alması, tübüler büzüşmeye bağlı testis atrofi izlenmiştir. Yine

Mercantepe ve ark. (2018)'nın çalışmasında bir apoptozis belirteci olan kaspaz-3 immunohistokimya bulgularına göre sisplatin verilen grupta özellikle A ve B tip spermatogonyumlarda, primer spermatosit ve spermatidlerde immunpozitif hücrelerin arttığı görülmüştür. Sisplatin+kurkumin grubunda Sertoli hücreleri ve spermatidlerde immunpozitif hücrelerin azaldığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızın sonuçlarında da SİS-10 ve SİS-15 gruplarında apoptozis anlamlı derece artmasına rağmen, kurkuminin verilmesi apoptozis atışını daha da şiddetlendirmiştir. Sisplatin+kurkumin grubundaki farklılıkların sebebinin çalışmamızda kurkumini iki kat daha fazla dozda kullanmamız ve uygulama süresi ile zamanının farklı olmasından kaynaklandığı kanısındayız.

Mercantepe ve ark. (2018)'nın elektron mikroskopik sonuçlarında sisplatin grubunda bazal laminada dejenerasyon görüldüğü, apoptotik spermatogonyum ve spermatositlerin olduğu, spermatogonyum ve spermatid çekirdeklerinde fragmentasyon görüldüğü, spermatogonyum çekirdekçiklerinde yoğunlaşma olduğu, spermatogonyum ve spermatidlerin mitokondrilerinin vakuolizasyon içerdiği bildirilmiştir. Sisplatin+kurkumin grubunda ise bazal laminanın, spermatid ile spermatositlerin ve yoğun matriks içeren mitokondrilerin normal bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda sisplatin verilen grupta benzer bulgular elde etmemize rağmen sisplatin+kurkumin gruplarında olumsuz etkilerin daha da şiddetlendiği görülmüştür. Şöyle ki, sitoplazmada multilamellar cisim oluşumu, mitokondride krista kaybı ile görülen dejenerasyon, otofajik vakuoller, apoptotik cisimler, vakuolizasyonda ve lipid damlacıklarında fazla miktarda artış olduğu dikkat çekmiştir.

Ekinci Akdemir ve ark. (2019)'nın sisplatin kaynaklı testis toksisitesi üzerine eugenolun antiapoptotik ve antioksidant etkileri araştırıldığı çalışmalarında Sprague Dawley sıçanlara tek doz 15 mg/kg sisplatin ip yolla enjekte edilmiş ve hayvanlar 72 saat sonra sakrifiye edilmiştir. Bu çalışmanın histopatolojik bulgularında sisplatin grubunda spermatogonyumlarda dejenerasyon ve nekroz, lümende az sayıda spermatozoa, intestisyel aralıklarda ödem, damar dilatasyonu ve hiperemi tespit edilmiştir. Bu bulgular bizim ışık mikroskopik bulgularımızla paralellik göstermektedir. Bu çalışmada doz ve süre açısından farklılık olsa da çalışmamızda yaptığımız Johnsen kriterleri değerlendirmesine göre her ne kadar sisplatin ile birlikte kurkumin verilen gruplarda daha şiddetli olsa da tüm sisplatin grupları da kontrol gruplarına göre anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Aynı çalışmada gruplar arasında kaspaz-3 ekspresyonu karşılaştırıldığında sisplatin grubunda spermatogonyum ve spermatosit sitoplazmasında ekspresyon daha şiddetli bulunmuştur. Yalnızca eugenol verilen grupta kaspaz-3 ekspresyonu görülmezken, sisplatinle birlikte eugenol verilen grupta sisplatin verilen grupla karşılaştırıldığında orta şiddette ekspresyon tespit edilmiştir. Bizim

çalışmamızın % TUNEL pozitif tubulus oranının sisplatin ve sisplatinle birlikte kurkumin verilen gruplar da kontrol gruplarına göre anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuştur.

5.3. İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler

Erkeklerin üreme çağında etkilendiği en yaygın kanser türü olan testis kanseri dünyada hızla yayılmaktadır (Shanmugalingam ve ark, 2013); bununla birlikte erken teşhis ve tedavi protokollerindeki gelişmelerden dolayı ölüm oranları dikkat çekici bir şekilde düşmüştür (Elzinga-Tinke ve ark, 2015; Robinson D ve ark, 2007). Kemoterapotik ilaç kokteyli olan bleomisin, etoposid ve sisplatinin (BEP) birlikte uygulanması testis kanseri hastalarının ömrünün 5 yıl uzamasını %90 üzerinde arttırmıştır (Einhorn ve Foster, 2006; Huddart ve Birtle, 2005; Kopp ve ark, 2006). O’Flaherty ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları çalışmalarında BEP ile tedavi edilmiş hastalarda tedavi sonrası 24. aya kadar anlamlı derecede DNA hasarı ve kromatin yoğunlaşmasında azalmaya sebep olan BEP’in sperm kromatin kalitesi üzerinde kalıcı etkisi olduğunu göstermiştir. Maselli ve arkadaşlarının 2012 ve 2013 yıllarında yapmış oldukları hayvan çalışmalarında BEP ile tedavi edilmiş Kahverengi Norveç Sıçanlarında somatik histonların sayısının anlamlı derecede artışıyla birlikte, sıçanlarda bilinen tek protamin (PRM) olan PRM 1’in ekspresyonunun düştüğü ve bu yüzden germ hücrelerinde histon çekilmesinin sorunlu olduğu ileri sürülmüştür. Bu sayede kromatin şekillenmesine katılan sperm başındaki proteinler üzerine BEP’in kalıcı etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Bagheri-Sereshki ve arkadaşları 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada; normal sperm kromatin yoğunlaşmasındaki potansiyel mekanizmayı açıklamak için, erkek germ hücre kromatin şekillenmesinin tüm fazlarında, BEP muamelesinin histon modifikasyonları üzerindeki etkilerini tespit etmeyi amaçlamışlardır. Bu çalışmada saflaştırılmış proteinlerden modifikasyona uğramış anahtar histonların ekspresyonunu belirlemek için Western blot analizi yapılmıştır. Bu sonuçlara göre, BEP muamelesi sonrası pakiten spermatositlerde kromatinin yeniden şekillenmesine dahil olan genlerin transkripsiyonuna olanak vermesi için nükleozomların destabilize olmadığını gösteren, H3K9m (H3 histonunun 9. lizinde monometillenme) ekspresyonu anlamlı derecede yükselmiş ve tH2B (veya Hist1h2ba) ekspresyonu anlamlı derecede düşmüştür. Ayrıca BEP muamelesi, histon çekilmesinin sorunlu olduğunu gösteren ve olgun spermatozoada gevşek kromatin yapısına sebep olan H4K8ac ekspresyonunu değiştirmiştir. Daha az yoğunlaşmış sperm kromatininin sperm epigenomunda değişimlerle birlikte erkek fertilitesi üzerine olumsuz etkilerinin olduğu

bilinmektedir. Aynı çalışmada sıçan spermatogenezinde kromatin şekillenmesiyle ilgili histon modifikasyonları immunohistokimyasal teknikler kullanılarak gösterilmiş ve germ hücre kromatin şekillenmesi sırasında gerçekleşen işaretler üzerine BEP'in etkileri belirlenmiştir. Çalışmanın analiz sonuçları hem aktif işaretler olan H4K5, K8 ve K12 asetilasyonu (ac) hem de baskılayıcı işaretler olan H3K9m ve H2AK119u'nun germ hücre gelişimi sırasında son derecede dinamik olduğunu göstermiştir. BEP muamelesi, I-III. evre yuvarlak spermatidlerde H4K8ac'nin immunofloresan yoğunluğunu önemli ölçüde düşürürken IV-VI evre yuvarlak spermatidlerde anlamlı ölçüde arttırmıştır. Ayrıca, I-III. evrelerde H4K12ac'nin immunofloresan yoğunluğu düşmüştür. H4K12ac, H4K5ac veya H3K9m proteinlerinin uzayan spermatidlerde floresan yoğunluğu BEP muamelesi sonrası değişmemiştir. Bu sonuçlar Western blot analizlerini doğrulamakta ve kromatinin yeniden şekillenmesine dahil olan histon işaretleri üzerinde BEP muamelesiyle indüklenmiş değişikliklerin hücre ve evreye özgü olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın immunohistokimyasal sonuçları sisplatin uygulanan 5 günlük (SİS-5) deney grubumuzdaki immunohistokimyasal bulgularımızı desteklemektedir. Bizim sonuçlarımıza göre TP1 proteini immunpozitivitesi hücre ve evreye özgü olarak bulunmuş ve SİS-5 deney gruplarında incelenen her üç evrede uzamış spermatidlerde kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. TP proteini ile ilgili kematerapötik ajanlar üzerine yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte Western blot analizi ileride yapılacak çalışmalar için önerilmektedir. Çalışmamızın immunohistokimyasal bulguları bu açıdan düşünüldüğünde bir ilk olmaktadır.

Diğer yandan ROT'un, onkojenik mutasyonlara neden olabildiği ve onkojenik yolları aktive edebildiği bilinmektedir. Fakat antioksidanlarla tedavinin bazı kanserleri başlattığı veya tam tersine bazı kanserlerin ilerlemesini baskıladığı bildirilmiştir (Gorrini ve ark., 2013; Lewis ve ark., 2014; Fan ve ark., 2014; Ye ve ark., 2014; Chandel ve ark., 2014). Benzer şekilde; bazı çalışmalarda antioksidanların veya antioksidan enzimlerin kanserin başlamasını baskıladığı gösterilmekle birlikte (Gao ve ark, 2007; Teoh-Fitzgerald ve ark, 2014; Glasauer ve ark, 2014); bazı çalışmalarda da kanserin başlamasını uyardığı bildirilmiştir (Harris ve ark, 2015; Sayin ve ark, 2014; DeNicola ve ark, 2011; Glasauer ve ark, 2014). Diyetle antioksidanların arttırılması kanserin başlamasını klinik denemelerde genellikle azaltmamıştır (Fortmann ve ark, 2013). Antioksidanların diyetle eklenmesinin gerçekte akciğer ve prostat kanserlerine sebep olduğu ve ölüme yol açtığını gösteren çalışmalar da vardır (Klein EA ve ark, 2011; Goodman GE ve ark, 2004). Piskounova ve ark. (2015)'nın yapmış oldukları bir çalışmada, melanomada antioksidanların metastazı arttırarak hastalık sürecini ilerlettiği bildirilmiştir.

Le Gal ve ark. (2015), diyetle antioksidan ilavesinin endojen malignant melanomalı farelerde tümör süreci ve metastaz ayrıca malignant melanoma hücre hatlarında proliferasyon, migrasyon ve yayılması üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada antioksidan N-acetylsysteine (NAC-ROT'u bertaraf eder.) uygulamasının lenf nodu metastazı sayısını ve her metastazda tümör hücreleri oranını arttırdığı, fakat primer tümörlerin sayısı ve boyutu üzerine etki etmediği kanıtlanmıştır. Söz konusu çalışmanın artmış metastaz bulguları kanser hastalarının antioksidanları dikkatle kullanmaları gerektiğini önermektedir. Bizim çalışmamızda da sisplatin ile birlikte verilen antioksidanın testislerde histopatolojik, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik bulguları daha da şiddetlendirdiğini göstermiştir. Çalışmamız bir kanser çalışması değildir fakat kemoterapötiklerle birlikte antioksidanların kullanılmasının sakıncalı olabileceğini göstermiştir.

5.4. Elektron Mikroskopik Bulgular

Aydiner ve arkadaşları 1995 yılındaki yapmış oldukları çalışmada 21 sıçana 5 mg/kg sisplatin ip olarak uygulamış ve deneyin 3, 12, 21 ve 28. günlerinde üçer sıçanı dekapite etmişlerdir. Bu çalışmanın elektron mikroskopi bulgularında kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında 3. ve 12. günlerde SER dilatasyonları, mitokondri yapısında bozulma, Sertoli-germinal hücre ve germinal hücreler arasında ilişki bozulması mevcutken; bu bozulmaların 21. gün deney grubunda düzelmeye başladığı ve 28. gün deney grubunda normale döndüğü görülmüştür. Lipid ve lipofuskin granüllerinde artışın ise 28. gün deney grubunda düzelmeye başladığı belirtilmiştir. Bu çalışmanın elektron mikroskopik bulguları sisplatin uygulanan 15 günlük (SİS-15) deney grubumuzdaki elektron mikroskopik bulgularımızı desteklemektedir. Bizim çalışmamızda sisplatin uygulamasının 15. gününde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; gelişim evrelerinin bir çoğunda bazal kompartman hücreleri arasında interselüler mesafenin arttığı ve hücreler arası ayrılmaların olduğu izlenmiş, özellikle Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seri hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinin bozulduğu görülmüştür. Adluminal kompartmanda bulunan hücreler arasına uzanan Sertoli hücrelerinin sitoplazmik uzantıları içerisinde vakuolizasyon dikkat çekmiş ve bu hücrelerde sitoplazmada lipofuskin granüllerinde artış izlenmiştir. Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seri hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerinde bozulma neticesinde gerçekleşen interselüler mesafedeki artış spermatositler arasında da görülmüştür. Sekonder spermatositte de lipofuskin granüllerinde artış ile birlikte yuvarlak spermatidlerde plazma membranı etrafında dizilmiş mitokondrilerde krista kaybı dikkat çekmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmada deney sonu ağırlık ortalamalarının sisplatin ve sisplatin+kurkumin gruplarında kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü. Bu azalma detaylı olarak incelendiğinde SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 deney gruplarının ağırlık ortalamalarının diğer tüm gruplardan anlamlı olarak farklı olduğu saptandı. Sisplatinle birlikte kurkuminin verilmesi ağırlık kaybında etkili olmuştur. Diğer yandan testis ağırlık ortalamalarının yine SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 gruplarında anlamlı bir şekilde düştüğü ve sisplatinle birlikte kurkumin verilmesinin bu düşüşte etkili olduğu görülmüştür.

Seminifer tubulus çap ortalamaları gruplar arası karşılaştırıldığında SİS-10, SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 deney gruplarındaki daralma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu daralmanın sisplatinle birlikte kurkumin verilen gruplarda sisplatin verilen grup ile karşılaştırıldığında şiddetlendiği dikkat çekmiştir.

Johnsen kriterlerine göre değerlendirilen histokimyasal bulgular göz önünde bulundurulduğunda yukarıda açıklanan sonuçlara paralel bulgular elde edilmiştir. SİS KMN-10 ve SİS KMN-15 gruplarında spermatogenetik arrest en çok göze çarpan dejenerasyon olarak belirlenmiştir. Mevcut çalışma tümör modelinde olmamakla birlikte sisplatinle birlikte kurkumin kullanımının infertiliteye yol açabileceğini ve özellikle testis kanseri tedavisi gören ve sisplatin kullanan hastaların kurkumin kullanmamaları gerektiğini, şayet bir antioksidan kullanacaklarsa uygun doz ve sürede doktor kontrolünde kullanmaları gerektiğini bir kez daha gündeme getirmiştir.

XII, XIII ve XIV. evrelerde uzamış spermatidlerde yerleşim gösteren TNP-1 immunopozitif hücrelerin SİS-5 deney grubunda her üç evrede de artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar bize DNA paketlenmesi sırasında gerçekleşen olayların sisplatinden etkilenebileceğini ve kromatinin gevşek paketlenmesinin infertiliteye yol açabileceğini düşündürmüştür. İleride bu konuyla ilgili yapılacak olan çalışmalar için Western Blot Analizi yapılmasının bu bulguları doğrulamak açısından önemli olacağı düşünülmektedir.

Testisteki apoptotik hücre sayıları göz önüne alındığında SİS KMN-10, SİS-10 ve SİS-15 deney gruplarında kontrollere göre anlamlı artışlar bulunmuştur. Bu üç deney grubu kendi arasında karşılaştırıldığında ise apoptoza giden hücre sayılarının SİS KMN-10 deney grubunda diğer iki gruba göre dramatik bir şekilde arttığı görülmüştür. SİS KMN-15 deney

grubunun yoğun dejenerasyondan dolayı apoptoz değerlendirmesine katılamadığı göz önüne alındığında sisplatinle birlikte kurkumin verilmesi reaktif oksijen radikallerini daha da arttırarak hücreleri apoptoza sürüklemiş olabilir. Esasında, tümör hücrelerinde apoptoz olması kanserin ilerlemesini durdurmak için doğru bir yol olarak görülmektedir; fakat çalışmamızda bir tümör modeli oluşturmadığımız düşünülürken sisplatinle birlikte kullanılan kurkuminin sağlıklı hücelere verdiği zarar kaçınılmazdır. Bu durumun da tedavi gören kemoterapi hastalarına ağır hasarlar vereceği öngörülmektedir.

Çalışmamızda 15 günlük deney gruplarında gerçekleştirdiğimiz elektron mikroskopik bulgular bize SİS KMN-15 deney grubunda yoğun dejenerasyonun, apoptotik cisimlerin, nekroza uğrayan hücrelerin varlığını göstermiş ve sisplatinle verilen kurkuminin koruyucu etkisinden çok zararı olduğunu bir kez daha gözler önüne sermiştir. Öte yandan diğer 15 günlük gruplar değerlendirildiğinde SİS KMN-15 deney grubu kadar olmasa da SİS-15 deney grubunda da hücreler arası mesafenin ve vakuolizasyonla birlikte lipofuskin granüllerindeki artışın hücre yaşlanmasına sebebiyet verebileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda 15 gün boyunca yalnızca kurkumin verilen deney grubunda da mitokondrilerdeki dejenerasyon ve hücrelerarası ayrılımların kontrol grubuna göre farklılık gösterdiği görülmüştür. Bu bulgu bize bir antioksidan olan kurkuminin tek başına kullanılırken bile kontrollü kullanılması ve doktor nezaretinde doz ve süresinin ayarlanması gerektiğini göstermiştir.

Tüm bu bulguların ışığında çalışmamız bizi aşağıdaki sonuçlara götürmüştür;

1. Özellikle testis kanserlerini tedavide kullanılan bir antineoplastik ajan olan sisplatin uygulama dozu ve süresine bağlı olarak seminifer tübül çaplarında daralmaya yol açarak testiste atrofiye neden olabilir.
2. İleride yapılacak DNA paketlenmesi çalışmaları için daha objektif sonuç vereceğine inandığımız Western Blot analizi önerilmektedir.
3. İleride tümör modelleri kullanılarak yapılacak çalışmalarda kurkuminin sisplatinle kullanılması ve bu hücreleri apoptoza sürükleyerek kanserin baskılanması üzerine etkileri değerlendirilebileceği gibi normal hücrelerde hücre siklusunu düzenleme yolu da diğer bir düşünülmesi ve çalışılması gereken konudur.
4. Hem ışık hem de elektron mikroskopik bulgular sisplatinle birlikte kurkumin verilen gruplarda süreye bağlı olarak spermatogenezde arrest ve hücre kayıplarından kaynaklı yoğun morfolojik dejenerasyon olduğunu göstermiştir.
5. Tezin tartışma bölümünde de belirtildiği gibi önceki çalışmalarda kurkumin sisplatin enjeksiyonundan önce verilmiş ve koruyucu etkisinin olduğu görülmüştür. Her ne kadar bu çalışmada kurkumin sisplatin enjeksiyonuyla birlikte verilmiş olsa da değil

koruyucu etkisi olumsuz etkilerinin süreye bağılı olarak dramatik bir şekilde arttığı görülmüştür. Bulgularımızda bahsettiğimiz bu olumsuz sonuçlarla ilgili yapılmış olan çalışmalar sınırlıdır. Çalışmamızın özellikle sisplatinle tedavi edilen kanser hastalarındaki DNA paketlenmesi ve morfolojik değişimler ile ilgili ileride yapılacak çalışmalara ışık tutacağı ve literatürde önemli bir açığı kapatacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Abe Y, Hashimoto S, Horie T.** Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacological Research* 1999, 39, 41-47.
- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC.** Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research* 2003, 23(1A), 363-98.
- Aggarwal BB, Surh Y-J, Shishodia S.** The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. (Advances in Experimental Medicine and Biology Book 595) Springer 2007 Edition, 511.
- Ahmed EA, Omar HM, Elghaffar SKh, Ragb SM, Nasser AY.** The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and L-cysteine against Cisplatin induced testicular oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2011 May, 49(5), 1115-21.
- Akay MT.** Sitoloji (5. Baskı), Palme Yayıncılık, Ankara 2012, 184.
- Ekinci Akdemir FN, Yildirim S, Kandemir FM, Aksu EH, Güler MC, Kızıltunç Özmen H, Küçükler S, Eser G.** The antiapoptotic and antioxidant effects of eugenol against cisplatin-induced testicular damage in the experimental model. *Andrologia* 2019,51:e13353.
- Aktas C, Kanter M, Erboğa M, Öztürk S.** Anti-apoptotic effects of curcumin on cadmium induced apoptosis in rats. *Toxicology and Industrial Health* 2012 Mar, 28(2), 122-30.
- Alfonso PJ, Kistler WS.** Immunohistochemical localization of spermatid nuclear transition protein 2 in the testes of rats and mice. *Biology of Reproduction* 1993, 48, 522–529.
- Ammon, H.P.,Wahl, M.A.** Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Medica* 1991, 57 (1), 1-7.
- Ammon, H.P., Anazodo, M.I., Safayhi, H., Dhawan, B.N.,Srimal, R.C.** Curcumin: a potent inhibitor of leukotriene B4 formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). *Planta Medica* 1992, 58 (2), 226.
- Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT.** DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *Journal of Andrology* 2005, 26:741–8

Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *Journal of Andrology* 2006, 27, 890–8.

Aydiner A, Aytakin Y, Sayın Ü, Kuntsal L, Topuz E. Cisplatin'in testis dokusuna etkisi: ultrastrüktürel ve biyokimyasal bir çalışma. *Türk Patoloji Dergisi* 1995, 11-1:5-9.

Atessahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Ceribası AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology* 2006, 21, 42–47.

Ausio J. H1 and evolution of sperm nuclear basic proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 1999, 274, 31115–31118.

Bagheri-Sereshki N, Hales BF, Robaire B. The effects of Chemotherapeutic agents, Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin on chromatin remodeling in male rat germ cells. *Biology of Reproduction* 2016, 94(4), 81, 1-9.

Baharuddin P, Satar N, Fakuriddin KS, Zakaria N, Lim MN, Yusoff NM, Zakaria Z, Yahaya BH. Curcumin improves the efficacy of cisplatin by targeting cancer stem-like cells through p21 and cyclin D1-mediated tumour cell inhibition in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncology Reports* 2015, 35, 13-25.

Balhorn R, Cosman M, Thornton K, Krishnan VV, Corzett M, Bench G, et al. Protamine-mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In: Gagnon C, editor. The male gamete: from basic science to clinical applications. Vienna: Cache River Press; 1999.

Balhorn N, Brewer L, Corzett M. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Molecular Reproduction and Development* 2000, 56, 230-234.

Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Biology* 2007, 8:227.

Baskaran R, Rao MR. Interaction of spermatid-specific protein TP2 with nucleic acids, in vitro. A comparative study with TP1. *The Journal of Biological Chemistry* 1990, 265, 21039–47.

Bayrak O, Uz E, Bayrak R, Turgut F, Atmaca AF, Sahin S, Yıldırım ME, Kaya A, Cimentepe E, Akcay A. Curcumin protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *World Journal of Urology* 2008, 26, 285–291.

Boekelheide K. Mechanisms of Toxic Damage to Spermatogenesis. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2005, (34), 6-8.

Boissonneault G. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* 2002, 514, 111–4.

Boroja T, Katanic J, Gvozden R, Selakovic D, Joksimovic J, Misic D, Stankovic V, Jovicic N, Mihailovic V. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity. *Food and Chemical Toxicology* 2018, 118, 252-263.

Bozok Çetintaş V, Eroğlu Z. Cisplatin direncinde etkili moleküler mekanizmalar. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2013, 20(2), 72-79.

Brewer L, Corzett M, Balhorn R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277, 38895–900.

Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2011, 11, 85-95.

Carrell DT, Emery R, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction*, 2007, 13(3), 313-327.

Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *Journal of Andrology* 2001, 22, 604–10.

Caron N, Veilleux S, Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Molecular Reproduction and Development* 2001, 58:437–43.

Chan MM. Inhibition of tumor necrosis factor by curcumin, a phytochemical. *Biochemical Pharmacology* 1995, 49, 1551-1556.

Chandel NS, Tuveson DA. The promise and perils of antioxidants for cancer patients. *The New England Journal of Medicine* 2014, 371, 177-178.

Chauvière M, Martinage A, Debarle M, Sautière P, Chevaillier P. Molecular characterization of six intermediate proteins in the processing of mouse protamine P2 precursor. *European Journal of Biochemistry* 1992, 204, 759–765.

Chen X, Wu Y, Dong H, Zhang CY, Zhang Y. Platinum-based agents for individualized cancer treatment. *Current Molecular Medicine* 2013 Dec, 13(10), 1603-12.

Cherry SM, Hunt PA, Hassold TJ. Cisplatin disrupts mammalian spermatogenesis, but does not recombination or chromosome segregation. *Mutation Research* 2004, 564, 115–128.

Cho JW, Lee KS, Kim CW. Curcumin attenuates the expression of IL-1 beta, IL-6 and TNF-alpha as well as cyclin E in TNF-alpha-mediated HaCaT cells; NF-kappaB and MAPKs as potential upstream targets. *International Journal of Molecular Medicine* 2007, 19, 469-474.

Chuang SE, Cheng AL, Lin JK, Kuo ML. Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2000, 38, 991–995.

Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G. Testicular function following chemo-radiotherapy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2004, 113, S1:S2–S6.

Bachmeier BE. Curcumin in Health and Disease. New York: Springer Publishing Company, 2019, 490p.

DeNicola GM, et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 2011, 475, 106-109.

de Yebra L, Ballezá JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertility and Sterility* 1998, 69, 755–9.

Einhorn LH, Foster RS. Bleomycin, etoposide, and cisplatin for three cycles compared with etoposide and cisplatin for four cycles in good risk germ cell tumors: is there a preferred regimen? *Journal of Clinical Oncology* 2006, 24, 2597-2598. Author reply 2598-2599.

Elzinga-Tinke JE, Dohle GR, Looijenga LHJ. Etiology and early pathogenesis of malignant testicular germ cell tumors: towards possibilities for preinvasive diagnosis. *Asian Journal of Andrology* 2015, 17, 381-393.

Fan J et al. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* 2014, 510, 298-302.

Fortmann SP, ve ark. Vitamin, mineral, and multivitamin supplements for the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: a systematic evidence review for the US preventive services task force. *Annals of Internal Medicine* 2013, 159, 824-834.

Gao P, et al. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell* 2007, 12, 230-238.

Gartner LP ve Hiatt JL. Male Reproductive System. In: Color Textbook of Histology (3th Ed.), Elsevier, USA 2007, 592, s:489-698.

Giannessi F, Giambelluca MA, Grasso L, Scavuzzo MC, Ruffoli R. Curcumin protects Leydig cells of mice from damage induced by chronic alcohol administration. *Medical Science Monitor* 2008, 14(11), BR237-242.

Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology* 2014, 92, 90-101.

Glasauer A, Sena LA, Diebold LP, Mazar AP, Chandel NS. Targeting SOD1 reduces experimental non-small-lung cancer. *Journal of Clinical Investigation* 2014, 124, 117-128.

Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology* 2008, 75(4), 787-809.

Golastaneh N, Wu M, Pant D, Jiang J, DeStefano D, Fernandez Bueno C, Rone JD, Haddad BD, Gallicano GI, Dym M. Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells and Development* 2009 Oct, 18(8), 1115-26.

Gorrini C, Harris I, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2013, 12, 931-947.

Goodman GE, ve ark. The beta-carotene and retinol efficacy trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow up after stopping beta-carotene and retinol supplements. *Journal of the National Cancer* 2004, 96, 1743-1750.

Govindarajan, V.S. Turmeric-chemistry, technology, and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1980, 12 (3), 199-301.

Grimes SR, Meistrich ML, Platz RD, Hnilica LS. Nuclear protein transitions in rat testis spermatids. *Experimental Cell Research* 1977, 110, 31–39.

Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The AAPS Journal* 2013, 15(1), 195-218.

Harris I, ve ark. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. *Cancer Cell* 2015, 27, 211-222.

Heidaran MA, Showman RM, Kistler WS. A cytochemical study of the transcriptional and translational regulation of nuclear transition protein 1 (TP1), a major chromosomal protein of mammalian spermatids. *The Journal of Cell Biology* 1988, 106, 1427–1433.

Hess RA, Schaeffer DJ, Eroschenko VP, Keen JE. Frequency of the stages in the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biology of Reproduction* 1990, 43(3), 517-24.

Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P and Bradbury EM. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA. *Journal of Biological Chemistry* 1993, 268, 305– 314.

Howell SJ, Shalet SM. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2005, 34, 12–17.

Howland RD, Mycek MJ. Lippincott Illustrated Rewiees.Çeviren: Prof.Dr. Filiz Onat, Doç.Dr. Zafer Gören, Doç.Dr. Atila Karaalp Farmakoloji. 3. Basım, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd.Şti., 2009, s:479-481.

Huddart RA, Birtle AJ. Recent advances in the treatment of testicular cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2005, 5, 123-138.

Ichijo H, Nishida E, İrie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997, 275, 90-4.

- Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A.** Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Human Reproduction* 2009, Vol.24, No.7 pp. 1717–1725.
- Jayaprakasha, G.K., Jagan, L., Rao, M., Sakariah, K.K.** Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. *Trends in Food Science & Technology* 2005, 16 (12), 533-548.
- Jayaprakasha, G.K., Rao, L.J., Sakariah, K.K.** (2006) Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry* 2006, 98 (4), 720-724.
- Jitoe, A., Masuda, T., Tengah, I.G.P., Suprpta, D.N., Gara, I.W., Nakatani, N. ve diğeri.** (1992) Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992, 40, 1337-1340.
- Johnsen SG.** Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes. Normal values and results of 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970, 1, 2–25.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley OR.** Basic Histology. Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2003, s.407-422.
- Kanter M, Tarladacalırs Topçu Y, Uygun M.** Cisplatin nefrotoksitesinde E vitamininin koruyucu etkileri: ışık ve elektron mikroskopik çalışma. *Tıp Araştırma Dergisi* 2007, 5(3), 83-90.
- Karasawa T, Steyger PS.** An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. *Toxicology Letters* 2015, 237, 219-227.
- Khanna, N.** Turmeric-nature's precious gift. *Current Science* 1999, 76, 1351– 1356.
- Kierszenbaum AL.** Part VI Chapter 20. In: *Histology and Cell Biology*, Mosby, New York 2002, 619, 540-542; Çev. Ed.: Demir R.- *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, Ankara 2006.
- Kistler WS, Noyes C, Hsu R, Heinrichson L.** The amino acid sequence of a testis-specific basic protein that is associated with spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 1975, 250, 1847–1853.

Kleene KC, Flynn JF. Characterization of a cDNA clone encoding a basic protein, TP2, involved in chromatin condensation during spermiogenesis in the mouse. *Journal of Biological Chemistry* 1987, 262, 17272–17277.

Klein EA, ve ark. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *The Journal of the American Medical Association* 2011, 306, 1549-1556.

Kopp HG, Kuczyk M, Classen J, Stenzl A, Kanz L, Mayer F, Bamberg M, Hartmann JT. Advances in the treatment of testicular cancer. *Drugs* 2006, 66, 641-659.

Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrology Dialysis Transplantation* 1997 Dec, 12(12), 2478-80.

Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins Basic Pathology. Çeviri Ed: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U. Hücre Hasarı, Hücre Ölümü ve Adaptasyonlar. In: Robbins Temel Patoloji (9. Baskı), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2013, 927, s:6,9.

Kundu TK, Rao MR. Zinc dependent recognition of a human CpG island sequence by the mammalian spermatidal protein TP2. *Biochemistry* 1996,35:15626–32.

Kunnumakkara, A.B., Guha, S., Krishnan, S., Diagaradjane, P., Gelovani, J., Aggarwal, B.B. Curcumin potentiates antitumor activity of gemcitabine in an orthotopic model of pancreatic cancer through suppression of proliferation, angiogenesis, and inhibition of nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Cancer Research* 2007, 67 (8), 3853-3861.

Lamkin J. Investigating the Role of p53 in the Germ Cell Apoptotic Pathway. 2011, DOI: 10.28971/142011LJ75.

Lanneau M, Loir M. An electrophoretic investigation of mammalian spermatid-specific nuclear proteins. *Journal of Reproduction and Fertility* 1982, 65, 163-170.

Laskey RA, Mills AD, Philpott A, Leno GH, Dilworth SM, Dingwall C. The role of Nucleoplasmin in Chromatin Assembly and Disassembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 1993, 339, 263-269.

Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, Dalin MG, Akyürek LM, Lindahl P, Nilsson J, Bergo MO. Antioxidants can increase melanom metastasis in mice. *Science Translational Medicine* 2015, 7, 308re8

Le Lannic G, Arkhis A, Vendrely E, Chevaillier P, Dadoune JP. Production, characterization, and immunocytochemical applications of monoclonal antibodies to human sperm protamines. *Molecular Reproduction and Development* 1993, 36: 106 – 112.

Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1952, Nov 20, 55(4), 548-73.

Lévesque D, Veilleux S, Caron N, Boissonneault G. Architectural DNA-binding properties of the spermatidal transition proteins 1 and 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 252, 602–9.

Lewis CA et. al. Tracing compartmentalized NADPH metabolism in the cytosol and mitochondria of mammalian cells. *Molecular Cell* 2014, 55, 253-263

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997, 389(6648):251-60.

Marcon L, Zhang X, Hales BF, Robaire B, Nagano MC. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rats spermatogonial stem/progenitor cells. *Journal of Andrology* 2011 Jul-Aug, 32(4), 432-43.

Marieb EN. The Reproductive System. In: *Essentials of Human Anatomy & Physiology*. 2009 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings. <http://pchs.psd202.org/documents/dpohlman/1519742856.pdf>.

Martianov I, Brancorsini S, Catena R, Gansmuller A, Kotaja N, Parvinen M, Sasonne-Corsi P, Davidson I. Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2005, 102, 2808-2813.

Maselli L, Hales B, Chan P, Robaire B. Exposure to bleomycin, etoposide and cis-platinum alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. *Biology of Reproduction* 2012, 86-166.

- Maselli L, Hales B, Robaire B.** The effects of chemotherapy with bleomycin, etoposide and cis-platinum (BEP) on rat sperm chromatin remodeling, fecundity and testicular gene expression in the progeny. *Biology of Reproduction* 2013, 89-85.
- Masuda, T., Isobe, J., Jitoe, A., Nakatani, N.** Antioxidative curcuminoids from rhizomes of *Curcuma cantorrrhyza*. *Phytochemistry* 1992, 31, 3645–3647.
- Mazumder A, Raghavan K, Weinstein J, Kohn KW, Pommier Y.** Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. *Biochemical Pharmacology* 1995, 49, 1165-1170.
- McPherson S, Longo FJ.** Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *European Journal of Histochemistry* 1993, 37, 109–128.
- Meistrich ML, Brock WA, Grimes SR, Platz RD, Hnilica LS.** Nuclear protein transitions during spermatogenesis. *Federation Proceedings* 1978, 37, 2522-2525.
- Meistrich ML.** Histone and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. In: Hnilica LS, Stein GS, Stein JL, editors. Histones and other basic nuclear proteins. Orlando, FL: CRC Press. 1989, p 165–182.
- Mercantepe T, Unal D, Tümkaya L, Yazıcı ZA.** Protective effects of amifostine, curcumin and caffeic acid phenethyl ester against cisplatin-induced testis tissue damage in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2018, 15, 3404-3412.
- Miller D., Brinkworth M., Iles D.** Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNAi histones, protamines and epigenetics? *Reproduction* 2010, 139(2), 287-301.
- Moon DO, Kim MO, Choi YH, Hyun JW, Chang WY, Kim GY.** Butein induces G(2)/M phase arrest and apoptosis in human hepatoma cancer cells through ROS generation. *Cancer Letters* 2010, 288, 204-13.
- Narayana K, Al-Bader M, Mousa A, Khan KM.** Molecular effects of chemotherapeutic drugs and their modulation by antioxidants in the testis. *European Journal of Pharmacology* 2012 Jan 15, 674(2-3), 207-16

Naz RK. Can curcumin provide an ideal contraceptive? *Molecular Reproduction and Development* 2011, 78(2), 116–123.

Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy* 1956, 99(3), 507-16.

O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Neill JD, Ed. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. San Diego, CA: Elsevier 2006; 1017-69.

Oliva R. Protamine and male infertility. *Human Reproduction Update* 2006, 12 (4): 417 – 435.

Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology; Saunders Elsevier PA, 2007. Çev. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. Erkek Üreme Sistemi. In: Netter Temel Histoloji (1. Baskı). Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara 2009, 533, s:378-379,

O'Flaherty CM, Chan PT, Hales BF, Robaire B. Sperm chromatin structure components are differentially repaired in cancer survivors. *Journal of Andrology* 2012, 33, 629-636.

Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 1991, 40, 25–94.

Özdamar ŞO, Uğuz AH, Sayan AE, Bahadır B, Bektaş S. Hücresel Uyum. In: Genel Patoloji (2. Baskı), Anadolu Üniversitesi Web Ofset Tesisleri, Eskişehir 2011, 286, s 114.

Pari L, Tewas D, Eckel J. Role of curcumin in health and disease. *Archives Physiology Biochemistry* 2008, 114(2), 127-49.

Park BH, Lim JE, Jeon Hg, Seo SI, Lee HM, Choi HY, Jeon SS, Jeong BC. Curcumin potentiates antitumor activity of cisplatin in bladder cancer cell lines via ROS-mediated activation of ERK1/2. *Oncotarget* 2016, 7, 63870-63886.

Piskounova E, Agathocleous M, Murphy M, Hu Z, Huddlestun S, Zhao Z, Leitch A, Johnson TM, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* 2015, 527, 186-191.

Pradeepa MM, Rao MRS. Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: Role of testis specific histone variants and transition proteins. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 2007, 63, 1-10.

Ramm SA, Scharer L. The evolutionary ecology of testicular function: size isn't everything. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 2014 Nov, 89(4):874-88.

Reddy, A.C., Lokesh, B.R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1992, 111 (1-2), 117-124.

Rithaporn T, Monga M, and Rajasekaran M. Curcumin: a potential vaginal contraceptive. *Contraception* 2003, 68(3), 219–223.

Robinson D, Moller H, Horwich A. Mortality and incidence of second cancers following treatment for testicular cancer. *British Journal of Cancer* 2007, 96, 529-533.

Rosenberg B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer*. 1985 May 15, 55(10), 2303-16.

Ross MH, Pawlina W. Cell Nucleus. In: Histology: A Text And Atlas 6/E, Lippincott, USA 2011. Çev.Edt. Barış Baykal. Hücre Nükleusu. In: Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas (6. Baskıdan çeviri), Palme Yayıncılık, Ankara 2014, 972, s: 75-97.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Staging for the rat. In: Histological and Histopathological Evaluation Of The Testis (1st edition), Cache River Press, US 1991, 286, s: 63-118.

Sarvalkar, PP, Walvekar, MV, Bhopale, L.P. Antioxidative effect of curcumin (*Curcuma longa*) on lipid peroxidation and lipofuscinogenesis in submandibular gland of D-galactose-induced aging male mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5 (20), 5191-5193.

Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sung, B., Ahn, K.S., Murakami, A., Sethi, G. ve diğerleri. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis* 2007, 28 (8), 1765-1773.

Sayin V, ve ark. Antioxidant accelerate lung cancer progression in mice. *Science Translational Medicine* 2014, 6, 215-221.

Schlüter G, Celik A, Obata R, Schlicker M, Hofferbert S, Schlung A, Adham IM, Engel W. Sequence analysis of the conserved protamine gene cluster shows that it contains a fourth expressed gene. *Molecular Reproduction and Development* 1996, 43, 1–6.

Shanmugalingam T, Soultati A, Chowdhury S, Rudman S, Van Hemelrijck M. Global incidence and outcome of testicular cancer. *Clinical Epidemiology* 2013, 5, 417-427.

Sharma OP. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochemical Pharmacology* 1976, 25 (15), 1811-1812.

Sharma R, Agarwal A. Spermatogenesis: An Overview. Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction, DOI 10.1007/978-1-4419-6857-9_2.

Shukla PK, Khanna VK, Ali MM, Khan MY, Srimal RC. Anti-ischemic effect of curcumin in rat brain. *Neurochemical Research* 2008, 33, 1036-1043.

Songur A, Karateke H, Tosun M, Gönül Y, Turamanlar O. Ratlarda Postnatal Dönemde Testis Dokusu ile Kan Testis Bariyerinin Gelişiminin Histomorfometrik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirilmesi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2016, 17, 52-59.

Srimal, R.C. Turmeric: A brief review of medicinal properties. *Fitoterapia* 1997, LXVIII, 483-499.

Sreejayan,Rao, M.N. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1994, 46 (12), 1013-1016.

Staub C, Johnson L. Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal* 2018, 12(s1):s27-s35.

Ströfer M, Jelkmann W, Depping R. Curcumin decreases survival of Hep3B liver and MCF-7 breast cancer cells: the role of HIF. *Strahlenther Onkol* 2011, 187, 393-400.

Szczygiel MA and Ward WS. Combination of dithiothreitol and detergent treatment of spermatozoa causes paternal chromosomal damage. *Biology of Reproduction* 2002, 67,1532–1537.

Rhizoma Curcumae Longae, WHO monographs on selected medicinal plants (c. Vol 1). (1999). World Health Organisation.

Teoh-Fitzgerald MI, Fitzgerald MP, Zhong W, Askeland RW, Domann FE. Epigenetic reprogramming governs EcSOD expression during human mammary epithelial cell differentiation tumorigenesis and metastasis. *Oncogene* 2014, 33, 358-368.

Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H., Takino, Y. Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo) 1985, 33 (4), 1725-1728.

Türk G, Ceribaşı AO, Sahna E, Ateşşahin A. Lycopene and ellagic acid prevent apoptosis induced by cisplatin. *Phytomedicine*. 2011 Mar 15, 18(5), 356-61.

Türk G, Atessahin A, Sönmez M, Ceribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertility and Sterility* 2008, 89, 1474–1481.

Unnikrishnan, M.K., Rao, M.N. Curcumin inhibits nitrite-induced methemoglobin formation. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* 1992, 301 (2), 195-196.

Verma RJ, Mathuria N. Effect of curcumin on aflatoxin-induced biochemical changes in testis of mice. *Fertility and Sterility* 2009, 91(2), 597–601.

Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2012, 12, 685-98.

Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 2005, 4, 307–320.

Ward WS, Partin AW, Coffey DS. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma* 1989, 98, 153–159.

WEB_1. (2018). Mayo Clinic İnternet Sitesi. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/scrotal-masses/symptoms-causes/syc-20352604>. (08.04.2020).

WEB_2. Yale Üniversitesi İnternet Sitesi. http://medcell.med.yale.edu/histology/cell_lab/euchromatin_and_heterochromatin.php. (09.04.2020).

WEB_3 (2002). <https://bioconductor.org/help/course-materials/2002/WyethCourse101702/GenBio/GenBio4.pdf>.

Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Curcumin attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. *Fertility and Sterility* 2009, 91(1), 271–277.

Weinberg F, Chandel NS. Reactive oxygen species-dependent signaling regulates cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009, 66, 3663–73.

Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, 107, 8788–93.

Wouters-Tyrou D, Martinage A, Chevaillier P, Sautiere P. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* 1998, 80, 117–128.

Xiaoyu X., Heng C, Shixiao Q, Chen X. Histone Acetylase Inhibitor Curcumin Impairs Mouse Spermiogenesis—An In Vitro Study. *PLoS ONE* 2012, 7(11), e48673.

Ye J et al. Serine catabolism regulates mitochondrial redox control during hypoxia. *Cancer Discovery* 2014, 4, 1406–1417.

Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weil MM, Behringer RR, Meistrich ML. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000, 97, 4683–4688.

Zhao M, Shirley CR, Yu YE, Mohapatra B, Zhang Y, Unni E, et al. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Molecular and Cellular Biology* 2001, 21, 7243–55.

EKLER

Ek 1



BOĞAZİÇİ ÜNİVERSİTESİ
Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

24.02.2016

Sayın Prof. Dr. Mustafa Sandıkçı,

Yürütücülüğünü üstlendiğiniz "Sisplatin uygulanan sıçanların testislerinde meydana gelen değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine kurkuminin etkisi" adlı, 22.02.2016/1 tarih ve kodlu başvurunuz, Boğaziçi Üniversitesi Kurumsal Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (BÜHADYEK) 24.02.2016 tarihli toplantısında görüşülerek onaylanmıştır.

Saygılarımızla,
BÜHADYEK Üyeleri:

Doç. Dr. Burak Güçlü (Başkan)
(Boğaziçi Üniv., Biyomedikal Müh. Enstitüsü)

Prof. Dr. Mehmet Kaya
(Koç Üniv., Tıp Fakültesi, Fizyoloji Böl.)

Yrd. Doç. Dr. Necla Birgül İyison
(Boğaziçi Üniv. Moleküler Biyoloji ve Genetik Böl.)

Yrd. Doç. Dr. Hande Yapışlar
(İstanbul Bilim Üniv. Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.B.D.)

Toplantıda bulunmamıştır.

Yrd. Doç. Dr. Elif Aysimi Duman
(Boğaziçi Üniv. Psikoloji Böl.)

Veteriner Hekim Arzu Temizyürek
(Boğaziçi Üniv. Vivarium)

Proje dışında yer almamaktadır.

Mete Demircan

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : ÖZKASAP ŞENTÜRK, Şengül
Uyruk : TC
Doğum yeri ve tarihi : Kuşadası, 25.02.1986
Telefon : 0543 229 0086
E-mail : sengulsenturk@beykent.edu.tr; biosengulozkasap@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce; YÖKDİL: 88.75

EĞİTİM

| Derece | Kurum | Mezuniyet tarihi |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Doktora | Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji (Veteriner) Doktora Programı | 2013- |
| Y. Lisans | İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı | 2009-2012 |
| Lisans | Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü | 2004-2008 |

İŞ DENEYİMİ

| Yıl | Yer/Kurum | Ünvan |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 2013-Devam ediyor | Beykent Üniversitesi Meslek Yüksekokulu Patoloji Laboratuvar Teknikleri Programı | Öğretim Görevlisi |

SERTİFİKALAR:

1. ÜYTE (Üremeye Yardımcı Teknikler) Laboratuvar Uygulamalı Sertifika Eğitim Programı, Embriyoloji ve Androloji Laboratuvar (tüp bebek) uygulamalarının teorik ve pratik eğitimi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi ÜYTE merkezi, Sertifika, 01.07.2018 -31.12.2018.
2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Deney hayvanları üzerinde yapılan deney ve uygulamalar konusunda teorik ve pratik eğitim, Bağcılar Devlet Hastanesi-Bağcılar, Sertifika, 20.09.2010 27.09.2010.

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

Kotil Tuğba, **Şentürk Şengül**, Sarioğlu Türkan, Tapul Leyla (2017). The effects of retinoic acid on mmp-2 production, proliferation and ultrastructural morphology in rat uterus. Experimental and Toxicologic Pathology, 69, 643-648. (Yayın No: 3747274).

2. PROJELER

1. Sisplatin uygulanan sıçanların testislerinde meydana gelen değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine kurkuminin etkisi doktora tez projesi- Adnan Menderes Üniversitesi BAP
2. Sıçanlarda spermatogenetik seriye ait hücreler üzerine retinoik asidin etkilerinin incelenmesi yüksek lisans tez projesi- İstanbul Üniversitesi BAP

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Özkasap Ş., Kotil T., Tapul L. (2013). Effects of retinoic acid on Leydig cell morphology. Microscopy Conference (MC) 2013, Regensburg, Germany (/)(Yayın No:596545)

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

1. **Şentürk Şengül**, Tapul Leyla (2016). Spermatogenetik seriye ait hücreler üzerine retinoik asidin etkilerinin ince yapı düzeyinde incelenmesi. Uluslararası katılımlı XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Özet Bildiri/Poster)(Yayın No:3431290)
2. **Özkasap Ş.**, Kotil T., Aktar F., Ekiz T. (2012). Fare ovaryumunda retinoik asidin etkilerinin incelenmesi . Uluslararası Katılımlı XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (/)(Yayın No:596143)
3. Kotil T., **Özkasap Ş.**, Tapul L. (2011). Retinoik asidin uterus ince yapısı üzerine etkileri . 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (/)(Yayın No:596322)